

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 965**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61K 38/37** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2010 E 10704152 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2398822**

54 Título: **Modificación de Factor VIII**

30 Prioridad:

**19.02.2009 EP 09153257**

**19.03.2009 US 161510 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.04.2013**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**  
**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**ZUNDEL, MAGALI;**  
**PESCHKE, BERND;**  
**KARPF, DITTE MARIA y**  
**MADSEN, KJELD**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 401 965 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).



- una composición farmacéutica que comprende un derivado de Factor VIII, tal y como se ha definido anteriormente, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable;

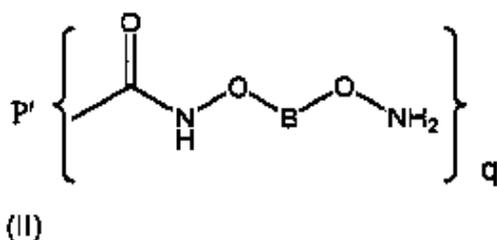
5 - un derivado de Factor VIII, tal y como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia;

- un derivado de Factor VIII, tal y como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento de la hemofilia A;

10 - uso de un derivado de Factor VIII, tal y como se ha definido anteriormente, en la producción de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia A;

15 - un método para tratar a un paciente con hemofilia A, este método comprende la administración a dicho paciente de un derivado de Factor VIII en una cantidad terapéuticamente eficaz, tal y como se ha definido anteriormente, o de una composición farmacéutica, tal y como se ha definido anteriormente;

- un derivado de Factor VIII de la fórmula (II):



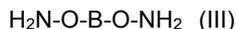
donde:

20 B representa un alquileo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>;

q representa un número entero de 1 a 20 y

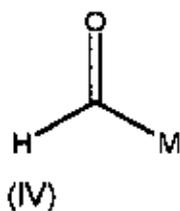
P' representa un mono o polirradical de Factor VIII obtenido eliminando grupos de carbamoil q de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII, o una sal derivada farmacéuticamente aceptable;

25 - un método para preparar un derivado de Factor VIII de la fórmula (II), tal y como se ha definido anteriormente, este método comprende reaccionar Factor VIII con un compuesto de la fórmula (III):



30 en presencia de una transglutaminasa, donde B es tal y como se ha definido anteriormente; y

35 - un método para preparar un derivado de Factor VIII de la fórmula (I), tal y como se ha definido anteriormente, este método comprende la reacción de un derivado de Factor VIII de la fórmula (II), tal y como se ha definido anteriormente, con un aldehído de la fórmula (IV):

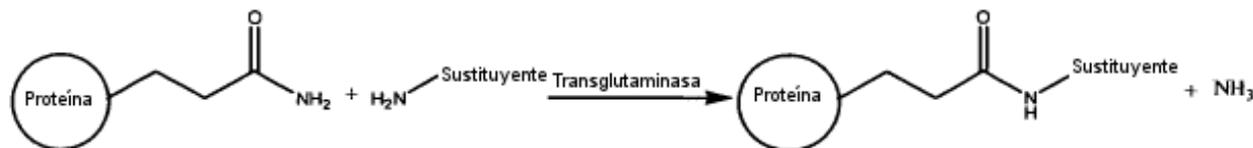


donde M es tal y como se ha definido anteriormente.

40 Descripción detallada de la invención

[0008] La presente invención proporciona nuevos derivados de Factor VIII que portan sustituyentes a un número limitado de sitios en la proteína. La sustitución regioselectiva del Factor VIII se controla mediante el método de preparación. Un paso importante del método de la invención es el uso de la enzima transglutaminasa (TGase). La transglutaminasa también se conoce como proteína-glutamina-y-glutamyltransferasa. La transglutaminasa cataliza la reacción general:

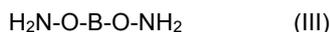
45



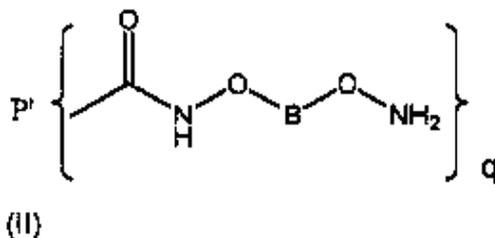
[0009] El grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$  de la proteína ilustrada anteriormente es la cadena lateral de un residuo de glutamina de la proteína.

[0010] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la transglutaminasa se dirige de forma selectiva a un número limitado de residuos de glutamina presentes en el Factor VIII. Las secuencias de los derivados de Factor VIII contienen 64-70 residuos de glutamina. No obstante, la transglutaminasa sólo se dirige a una minoría de estos residuos de glutamina. Típicamente, la transglutaminasa se dirige a 1-20 residuos de glutamina, preferiblemente de 1 a 15, más preferiblemente de 1 a 10 y de la forma más preferible de 1 a 7. De la forma más preferible, el derivado de FVIII es el compuesto de Factor VIII con el dominio B eliminado al que un péptido con la secuencia de SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR se fija al C-término de la cadena pesada. Este Factor VIII análogo tiene 66 residuos de glutamina. La transglutaminasa es la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraense* y el número de residuos de glutamina previstos por la enzima está entre 1 y 20.

[0011] El primer paso del método de la presente invención implica la reacción del Factor VIII con un compuesto de dihidroxilamina de la fórmula (III):



en presencia de una transglutaminasa. La transglutaminasa cataliza la reacción de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII con los grupos de amina en el compuesto de dihidroxilamina de la fórmula (III), para dar un derivado de Factor VIII de la fórmula (II):



donde:

B representa un alquileo  $\text{C}_2$  a  $\text{C}_{10}$ ;

q representa un número entero en el intervalo de 1 a 20 y

P' representa un mono o polirradical de Factor VIII obtenido por eliminación de los grupos de carbamoil q a partir de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII.

[0012] En una forma de realización B es  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ .

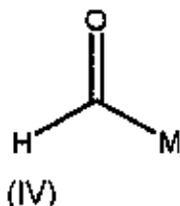
[0013] Como será evidente para un experto en la técnica, la formación del derivado de Factor VIII de la fórmula (II) implica la reacción de las cadenas laterales "q" de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII. Cada molécula de Factor VIII reacciona, por lo tanto, con moléculas "q" del compuesto de dihidroxilamina.

[0014] Típicamente, este paso de reacción se lleva a cabo en una solución acuosa, preferiblemente una solución acuosa tamponada. Las soluciones tampón adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica. La temperatura de dicha solución es típicamente de  $0^\circ\text{C}$  a  $60^\circ\text{C}$ , preferiblemente de  $20^\circ\text{C}$  a  $40^\circ\text{C}$ .

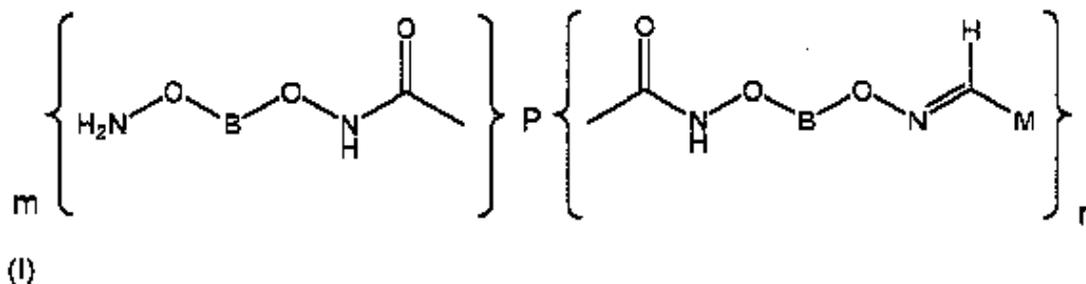
[0015] El número de residuos de glutamina modificados se pueden controlar por la concentración de cada uno de los reactivos que son, por un lado, FVIII o un análogo de FVIII y, por otro lado, el reactivo de bishidroxilamina. Asimismo, la concentración de enzima (medida en actividad) y el origen de la transglutaminasa se pueden utilizar para controlar la extensión de la reacción, el sitio o sitios de modificación y la velocidad de reacción.

[0016] El producto bruto se purifica generalmente por técnicas conocidas, tales como el intercambio iónico y/o la ultrafiltración.

[0017] La segunda fase del método de la presente invención implica la reacción del derivado de Factor VIII de la fórmula (II) con un aldehído de la fórmula (IV):



[0018] El aldehído de la fórmula (IV) y la fracción o fracciones  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{NH}_2$  del derivado de Factor VII de la fórmula (II) reaccionan para formar un derivado de Factor VII de la fórmula (I):



[0019] Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de reacción adecuadas para la fase anterior. Las condiciones de reacción exactas dependerán de la naturaleza del sustituyente M. Típicamente, dicha reacción ocurre en una solución acuosa, preferiblemente en una solución acuosa tamponada. Preferiblemente se usa un pH adecuado para la formación de oximas, donde el FVIII es estable, tal como por ejemplo pH 6,0-8,5, más preferiblemente pH 6,3-7,5. Las soluciones tampón adecuadas son conocidas por los expertos en el técnica. La temperatura de dicha solución es típicamente de 0°C a 60°C, preferiblemente de 20°C a 40°C. La reacción se puede monitorizar por técnicas conocidas para determinar una reacción o período de incubación óptimos. El producto bruto se purifica generalmente mediante técnicas conocidas, tales como el intercambio iónico y/o la ultrafiltración, antes de las siguientes fases.

[0020] Los derivados de Factor VIII de la fórmula (II) son productos intermedios útiles para la formación de un derivado de Factor VIII de la fórmula (I).

[0021] La suma de m y n en el derivado de Factor VIII de la fórmula (I) es igual a q en el derivado de Factor VIII de la fórmula (II) a partir de la que se obtiene. Así, (i) n de las fracciones  $q-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{NH}_2$  presentes en el derivado de Factor VIII de la fórmula (II) reaccionan con el aldehído de fórmula (IV) y (ii) m de las fracciones  $q-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{NH}_2$  presentes en el derivado de Factor VIII de la fórmula (II) no reaccionan con el aldehído de fórmula (IV). Cada molécula del derivado de Factor VIII de la fórmula (II), por lo tanto, reacciona con moléculas n del aldehído de la fórmula (IV).

[0022] En los compuestos de la fórmula (II), q representa un número entero de 1 a 20. Típicamente q representa un número entero de 1 a 15. Preferiblemente q representa un número entero de 1 a 10. Más preferiblemente q representa un número entero de 1 a 6.

[0023] En los compuestos de la fórmula (I), m representa 0 o un número entero de 1 a 19, n representa un número entero de 1 a 20 y la suma de m y n es de 1 a 20. Preferiblemente m representa 0 o un número entero de 1 a 14, n representa un número entero de 1 a 15 y la suma de m y n es de 1 a 15. Más preferiblemente m representa 0 o un número entero de 1 a 9, n representa un número entero de 1 a 10 y la suma de m y n es de 1 a 10. De la forma más preferible m representa 0 o un número entero de 1 a 5, n representa un número entero de 1 a 6 y la suma de m y n es de 1 a 6.

[0024] Como se utiliza en este caso, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal con un ácido o base farmacéuticamente aceptables. Los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen tanto ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico sulfúrico, fosfórico, difosfórico, bromhídrico o nítrico y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, fumárico, maléico, málico, ascórbico, succínico, tartárico, benzoico, acético, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico o p-toluenosulfónico. Las bases farmacéuticamente aceptables incluyen metal alcalino (p. ej. sodio o potasio) y metal alcalino térreo (p. ej. calcio o magnesio) hidróxidos y bases orgánicas tales como aminas de alquilo, aminas de aralquilo y aminas heterocíclicas.

[0025] La actividad de Factor VIII de los derivados mencionados anteriormente típicamente es sustancialmente la misma que la actividad del Factor VIII humano activado. La "actividad de FVIII" se define como la capacidad para funcionar en

la cascada de coagulación, inducir la formación de Factor Xa vía interacción con el Factor IXa de una plaqueta activada y soportar la formación de un coágulo sanguíneo. La actividad de Factor VIII se puede evaluar *in vitro* por técnicas tales como el análisis de coágulo, según se describe en, por ejemplo, Manucci y Tripodi, "Factor VIII clotting activity". E. C. A. T. assay procedures, London: Kluwer Academic Publishers, 1999; análisis del potencial de trombina endógeno, como se describe en Hemker *et al.*, "The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma.", *Thrombosis and haemostasis*, vol. 83:589-591; y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

[0026] Así, los derivados de Factor VIII de la invención se seleccionarán típicamente para valorar si han mantenido sustancialmente la misma actividad que el Factor VIII humano activado.

[0027] Como se utiliza en este caso, la actividad de Factor VIII sustancialmente igual a la actividad de Factor VIII humano activado significa que la actividad de Factor VIII es al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, así como al menos 100% de la del Factor VIII humano. La actividad de Factor VIII es, en particular, de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 75%, de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 85%, de aproximadamente el 85 a aproximadamente el 95% e incluso más del 100% de la del Factor VIII humano.

#### Transglutaminasa

[0028] El término "transglutaminasa", como se utiliza en este caso, se refiere a enzimas de la clase EC 2.3.2.13. Ejemplos de una transglutaminasa útil incluyen una transglutaminasa microbiana, típicamente de *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* y *Streptomyces griseo-carneum* (todas descritas en la patente de EEUU n°: 5.156.956, que se incorpora en el presente documento como referencia), *Streptomyces lavendulae* (descrita en la patente de EEUU n°: 5.252.469, que se incorpora en el presente documento como referencia) o *Streptomyces ladakanum* (JP-A-2003199569, que se incorpora en el presente documento como referencia). Debe observarse que los elementos del género anterior de *Streptoverticillium* están incluidos ahora en el género *Streptomyces* [Kaempfer, J. Gen. Microbiol., 137,1831-1892,1991].

[0029] Se han aislado otros ejemplos de una transglutaminasa útil microbiana a partir de *Bacillus subtilis* (descrito en la US 5.731.183, que se incorpora en el presente documento como referencia) y de varios *Myxomycetes*. Otros ejemplos de una transglutaminasa microbiana útil son las descritas en la WO 96/06931 (p. ej. transglutaminasa de *Bacillus lydicus*) y la WO 96/22366, ambas incorporadas como referencia.

[0030] Una transglutaminasa útil no microbiana incluye una transglutaminasa de hígado de conejillo de Indias, y una transglutaminasa de varias fuentes marinas tales como el pez plano *Pagrus major* (descrita en la EP-A-0555649, que se incorpora en el presente documento como referencia), y la ostra japonesa *Crassostrea gigas* (descrita en la patente de EEUU n°: 5.736.356, que se incorpora en el presente documento como referencia).

[0031] Otras transglutaminasas que se deberían mencionar son las transglutaminasas humanas TG2, TG3, TG7 o FXIII.

[0032] Otras transglutaminasas útiles no microbianas son las transglutaminasas humanas TG1 y TG6.

[0033] Se prefiere una transglutaminasa de *Streptomyces mobaraense*.

#### Factor VIII

[0034] La molécula de Factor VIII maduro consiste en 2332 aminoácidos que se pueden agrupar en tres dominios A homólogos, dos dominios C homólogos y un dominio B que se disponen en el siguiente orden: A1-A2-B-A3-C1-C2. Durante su secreción en el plasma, el Factor VIII se procesa intracelularmente en una serie de heterodímeros enlazados a ión de metal mientras el Factor VIII monocatenario se escinde en el límite B-A3 y en sitios diferentes dentro del dominio B. Este tratamiento conduce a una cadena pesada que consiste en el dominio A1, A2 y varias partes del dominio B, que tiene un tamaño molecular que varía de 90 kDa a 200 kDa. Las cadenas pesadas están ligadas vía un ión metálico a la cadena ligera, que consta del dominio A3, C1 y C2. En el plasma, este Factor VIII heterodimérico se enlaza con alta afinidad al Factor de von Willebrand (vWF), que lo protege de catabolismo prematuro. La vida media del Factor VIII no activado ligado a vWF es de aproximadamente 12 horas en plasma.

[0035] Durante el proceso de coagulación sanguínea, el Factor VIII se activa mediante escisión proteolítica por Factor Xa y trombina en los aminoácidos Arg372 y Arg740 dentro de la cadena pesada y en Arg1689 en la cadena ligera, dando como resultado la liberación del Factor de von Willebrand y generando el heterotrímero de Factor VIII activado que formará el complejo de tenasa en las superficies fosfolipídicas con Factor IXa y Factor X siempre que haya  $Ca^{2+}$ . El heterotrímero consiste en el dominio A1, un fragmento de 50 kDa, el dominio A2, un fragmento de 43 kDa y la cadena ligera (A3-C1-C2), un fragmento de 73 kDa. Así, la forma activa de Factor VIII (Factor VIIIa) consiste en una subunidad A1 asociada a través del enlace de ión metálico bivalente a una cadena ligera A3-C1-C2 escindida por trombina y una subunidad A2 libre asociada de forma relativamente débil al dominio A1 y A3.

[0036] Una molécula de Factor VIII que consiste en la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de Factor VIII conectada con un enlazador pequeño del dominio B (Factor VIII con el dominio B eliminado o BDD-FVIII) retiene la actividad biológica del Factor VIII de longitud total (nativo).

5 [0037] Como se utiliza en este caso, el término "Factor VIII" incluye cualquier polipéptido de Factor VIII que sea terapéuticamente útil, por ejemplo eficaz para la prevención o el tratamiento del sangrado. Esto incluye, sin limitación, Factor VIII humano tipo salvaje, Factor VIII híbrido humano/porcino, Factor VIII humano con el dominio B eliminado y Factor VIII humano con el dominio B parcialmente eliminado.

10 [0038] El término "Factor VIII" tiene el propósito de abarcar, sin limitación, los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos tal y como se describe en Toole *et al.*, Nature 1984, 312: 342-347 (Factor VIII humano de tipo salvaje), al igual que el derivado de Factor VIII de tipo salvaje de otras especies, tales como, por ejemplo, Factor VIII bovino, porcino, canino, murino y de salmón. Además, abarca variaciones alélicas naturales de Factor VIII que pueden existir y ocurrir de un individuo a otro. También, el grado y la ubicación de la glicosilación u otras modificaciones

15 postraduccionales pueden variar dependiendo de las células huésped elegidas y la naturaleza del entorno celular huésped. El término "Factor VIII" también tiene la intención de abarcar formas no divididas (zimógeno), al igual que las procesadas proteolíticamente para producir sus formas bioactivas respectivas, que se pueden denominar Factor VIIIa.

[0039] El término "Factor VIII" tiene la intención de abarcar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos ligeramente modificada, por ejemplo, polipéptidos que tienen un extremo N-terminal que incluye delecciones o adiciones de aminoácido en el N-terminal, y/o polipéptidos que se han modificado químicamente con respecto al Factor VIII humano. El término "Factor VIII" tiene la intención de incluir variantes de Factor VIII, con independencia de que muestren sustancialmente la misma o mejorada bioactividad que el Factor VIII de tipo salvaje, o, alternativamente, que muestren bioactividad reducida o sustancialmente modificada con respecto al Factor VIII de tipo salvaje, incluyendo, de forma no

20 limitativa, polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del Factor VIII de tipo salvaje por inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos.

[0040] Ejemplos no limitativos de Factor VIII incluyen Factor VIII humano derivado del plasma tal y como se describe, por ejemplo, en Fulcher *et al.*; Proc. Acad. Nat. Sci. USA 1982; 79:1648-1652, y Fulcher *et al.*; Proc. Acad. Nat. Sci. USA 1982; 79:1648-1652, y Factor VIII porcino derivado del plasma tal y como se describe, por ejemplo, en Fass *et al.*; Blood 1982; 59: 594-600 y Knutson *et al.*; Blood 1982; 59: 615-624. Ejemplos no limitativos de variantes de secuencia de Factor VIII se describen, por ejemplo, en Lollar *et al.*; Blood 2000; 95(2): 564-568 (hybrid porcine/human FVIII polypeptides) y Lollar *et al.*; Blood 2001; 97(1): 169-174.

30

[0041] La clonación del ADNc para Factor VIII (Wood, W.I., *et al.* (1984) Nature 312, 330-336; Vehar, G.A., *et al.* (1984) Nature 312, 337-342) hizo posible expresar Factor VIII de forma recombinante llevando al desarrollo de diferentes productos de Factor VIII recombinante, que fueron aprobados por las autoridades reguladoras entre 1992 y 2003. El hecho de que el dominio B central de la cadena polipeptídica de Factor VIII que reside entre los aminoácidos Arg-740 y Glu-1649 no parezca ser necesario para actividad biológica completa también ha llevado al desarrollo de un Factor VIII con el dominio B eliminado. Véase también Kjalke M, Heding A, Talbo G, Persson E, Thomsen J y Ezban M (1995), "Amino acid residues 721-729 are required for full Factor VIII activity". Eur. J. Biochem: 234: 773-779. El Factor VIII, tal y como se utiliza en este caso, incluye todas las variantes de Factor VIII, incluidas aquellas en las que se han eliminado uno o más dominios o regiones.

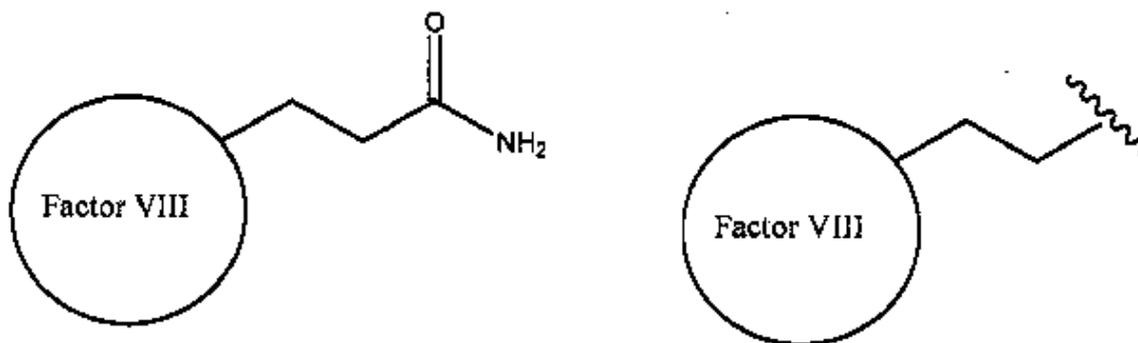
40

[0042] Las posiciones de los residuos de glutamina que reaccionan bajo catálisis de transglutaminasa se pueden determinar por asimilación directa con las enzimas adecuadas, tal como por ejemplo tripsina, seguida de mapeo peptídico o de mapeo peptídico con un grupo indicador, tal como por ejemplo biotina, o un grupo de fluorescencia, tal como por ejemplo Alexa 488. Típicamente, cuando el Factor VIII se reacciona con transglutaminasa de *Streptomyces mobaraense*, la mayor parte de los residuos de glutamina mostrados en la fórmula (I) pertenecen a las cadenas laterales de residuos de glutamina de la cadena pesada de Factor VIII. Preferiblemente, dichos residuos de glutamina están principalmente en el dominio A1.

50

[0043] Como se utiliza en este caso, el término "grupo de carbamoil" se refiere al radical -C(O)-NH<sub>2</sub>, tal y como se encuentra, por ejemplo, en la cadena lateral de un residuo de glutamina. Como se utiliza en este caso, el término "mono o polirradical de Factor VIII obtenido por eliminación de los grupos de carbamoil n + m o q de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII" significa que los grupos -C(O)-NH<sub>2</sub> n + m o q se eliminan formalmente de las cadenas laterales de los residuos de glutamina. Como el experto en la materia entenderá, el uso de estos términos no indica que un enlace de carbono-carbono se rompa en los residuos de glutamina, simplemente que la definición de "mono o polirradical de Factor VIII" que se utiliza en este caso no incluye las partes de carbamoil de uno o

60 más residuos de glutamina. Esto se ilustra a continuación:



5 [0044] El diagrama de la izquierda muestra la molécula de Factor VIII con una cadena lateral de glutamina. El diagrama a la derecha muestra un "mono de Factor VIII obtenido por eliminación de un grupo carbamoilo de la cadena lateral de un residuo de glutamina presente en el Factor VIII".

Fracciones ( $M^1$ ) que aumentan la vida media en plasma del derivado de Factor VIII

10 [0045] La reacción del derivado de Factor VIII de la fórmula (II) con un aldehído de la fórmula (IV) introduce una fracción M en el Factor VIII. En una forma de realización, M es una fracción ( $M^1$ ) que aumenta la vida media en plasma del derivado de Factor VIII.

15 [0046] El Factor VIII tiene un número de sitios de aclaramiento. Como se utiliza en este caso, el término "sitio de aclaramiento" se define como una región en la molécula de Factor VIII que es reconocida por la maquinaria fisiológica responsable de la degradación de la proteína. Así, la vida media del Factor VIII se puede aumentar mediante la interrupción de dichos sitios de aclaramiento introduciendo un sustituyente M1. Un "sitio de aclaramiento interrumpido" se define como un sitio de aclaramiento en la molécula de Factor VIII que muestra unión reducida a su receptor cognado o socio de interacción como resultado de la modificación anteriormente mencionada.

20 [0047] Así, la vida media en plasma de Factor VIII se puede mejorar introduciendo una o más fracciones en el Factor VIII que disgreguen los sitios de aclaramiento. Tales fracciones típicamente esconden, enmascaran o eclipsan uno o más sitios de aclaramiento en el Factor VIII. Así, en una forma de realización, la invención proporciona un derivado de Factor VIII con una vida media en plasma mejorada. La mejora es con respecto al Factor VIII correspondiente no modificado.

25 [0048] La vida media en plasma de Factor VIII o de un derivado de Factor VIII se determina midiendo la vida media en plasma *in vivo*. El Factor VIII humano tiene una vida media en plasma de aproximadamente 12-14 horas. La "vida media en plasma *in vivo*" es el tiempo en el que el 50% del Factor VIII o de un derivado de Factor VIII circula en el plasma o en el flujo sanguíneo antes de ser despejado. Determinar la vida media en plasma es típicamente más simple que determinar la vida media funcional y la magnitud de la vida media en plasma suele ser un buen indicio de la magnitud de la vida media *in vivo* funcional. Términos alternativos para vida media en plasma incluyen: vida media en suero, vida media circulante, vida media circulatoria, vida media de eliminación del suero, de eliminación del plasma y de eliminación.

35 [0049] El término "aumentado", tal y como se usa con respecto a la vida media en plasma, se utiliza para indicar que la vida media pertinente del derivado de Factor VIII ha aumentado de forma significativa estadísticamente con relación a la del Factor VIII no modificado, según se determina bajo condiciones comparables. Por ejemplo la vida media pertinente se puede aumentar en al menos aproximadamente 25%, tal como en aproximadamente 50%, por ejemplo, en al menos aproximadamente 100%, 150%, 200%, 250% o 500%. En una forma de realización, los derivados de Factor VIII de la presente invención muestran un aumento en la vida media de al menos aproximadamente 5 horas, preferiblemente al menos aproximadamente 24 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 72 horas y de la forma más preferible al menos aproximadamente 7 días, con respecto a la vida media del Factor VIII progenitor.

40 [0050] El término "Factor VIII progenitor", tal y como se utiliza en este caso, se refiere al Factor VIII específico del que se deriva el derivado de Factor VIII en cuestión.

45 [0051] La medición de la vida media en plasma *in vivo* se puede llevar a cabo de varias formas, tal y como se describe en la bibliografía. Un aumento de la vida media en plasma *in vivo* se puede cuantificar como una reducción en el aclaramiento (CL) o como un aumento en el periodo de permanencia medio (MRT). Los derivados de Factor VIII de la presente invención para los que el CL disminuye a menos del 70%, tal como a menos del 50%, tal como a menos del 20%, tal como a menos del 10% del CL del Factor VIII progenitor, tal y como se determina en un ensayo adecuado, se considera que tienen una vida media en plasma *in vivo* aumentada. Los derivados de Factor VIII de la presente invención para los que MRT aumenta a más del 130%, tal como a más del 150%, tal como a más del 200%, tal como a

más del 500% del MRT del Factor VIII progenitor en un ensayo adecuado, se considera que tienen una vida media en plasma *in vivo* aumentada. El aclaramiento y el periodo de permanencia medio se pueden evaluar en estudios farmacocinéticos estándar usando animales de ensayo adecuados. Está dentro de las capacidades de un experto en la técnica elegir un animal de ensayo adecuado para una proteína dada. Los ensayos en humanos, por supuesto, representan la prueba definitiva. Típicamente, y como un ejemplo, se inyecta a ratones, ratas, perros, simios o cerdos con el compuesto de interés. La cantidad inyectada depende del animal de ensayo. Posteriormente, se toman muestras de sangre durante un periodo de uno a cinco días, como sea apropiado, para la evaluación de CL y MRT. Las muestras de sangre se analizan de forma conveniente por técnicas de ELISA.

[0052] M<sup>1</sup> comprende típicamente uno o más polímeros hidrofílicos o ligantes de proteína plasmática. El polímero puede ser un polímero químico, tal como por ejemplo una fracción de polietilenglicol (PEG), o un biopolímero, tal como por ejemplo un polisacárido, fracciones de ácido polisialílico, fracciones de ácido hialurónico o polipéptidos. Un ejemplo de polisacárido es ácido polisialílico. Un ejemplo de polipéptido que consiste en un tipo de aminoácido es poli-Gly. Los polipéptidos que consisten en diferentes aminoácidos también se puede usar como ejemplos de la invención. Preferiblemente M<sup>1</sup> comprende (a) una fracción de PEG, un polipéptido de ácido polisialílico o un aglutinante de proteína plasmática, (b) una fracción de PEG y un ligante de proteína plasmática, (c) una fracción de PEG y un polipéptido, (d) un polipéptido y un ligante de proteína plasmática, (e) una fracción de ácido polisialílico y un ligante de proteína plasmática, o (f) una fracción de ácido polisialílico y un polipéptido.

[0053] El término "PEG", tal y como se utiliza en este caso, se refiere a poli(etileno glicol), también conocido como poli(etileno óxido) (PEO) o polioxietileno (POE), son poliéteres. El PEG se prepara por polimerización de óxido de etileno y está disponible comercialmente en una amplia variedad de pesos moleculares de 300 g/mol a 10.000.000 g/mol.

[0054] También existen diferentes formas de PEG dependiendo del iniciador usado para el proceso de polimerización. La forma más común de PEG es un éter metílico monofuncional PEG (metoxipoli(etileno glicol), abreviado mPEG.

[0055] Los PEGs también están disponibles con geometrías diferentes, tales como PEGs lineales y ramificados.

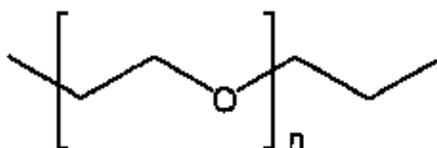
[0056] El PEG tiene la estructura HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)-n-H, la fórmula molecular C<sub>2n</sub>H<sub>4n+2</sub>O<sub>n+1</sub>, y el número de CAS [25322-68-3]. La masa molar depende, por supuesto, de n.

[0057] Los números que se incluyen frecuentemente en los nombres de los PEGs indican sus pesos medios moleculares, por ejemplo, un PEG con n=80 tendría un peso molecular medio de aproximadamente 3500 daltones y se marcaría como PEG 3500.

[0058] Muchos PEGs incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares, es decir, son polidispersos. La distribución del tamaño se puede caracterizar estadísticamente por su peso molecular medio en peso (M<sub>w</sub>) y su peso molecular medio en número (M<sub>n</sub>), cuya proporción se denomina índice de polidispersidad (M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>) (véase, por ejemplo, "Polymer Synthesis and Characterization", J. A. Nairn, University of Utah, 2003). M<sub>w</sub> y M<sub>n</sub> se pueden medir por espectroscopia de masas.

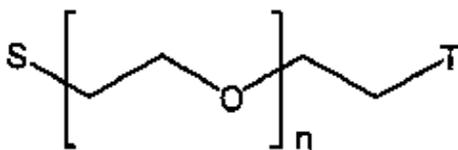
[0059] El índice de polidispersidad es, por consiguiente, un número que es mayor o igual a uno, y también se puede estimar a partir de datos cromatográficos de permeación por gel. Cuando el índice de polidispersidad es 1, el producto es monodisperso y, de este modo, formado por compuestos con un único peso molecular. Cuando el índice de polidispersidad es mayor de 1, el polímero es polidisperso y el índice de polidispersidad muestra cuán amplia es la distribución de polímeros con diferentes pesos moleculares. El índice de polidispersidad aumenta típicamente con el peso molecular de PEG o mPEG.

[0060] Para los fines de la presente, los términos "PEG" y "Peg" se usan de forma intercambiable y básicamente se refieren a un radical o dirradical que comprende la estructura



donde n es un número entero mayor de 1.

[0061] El término PEG se pretende que indique poli(etileno glicol) al igual que éter de monoalquilo de poli(etileno glicol), donde alquilo indica alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el Peg para su uso según la invención se representa por la siguiente fórmula:



5 en la que n es un número entero mayor de 1, y S y T designan independientemente alquiloxi, hidroxil, o están ausentes. Como se ha explicado anteriormente, un compuesto de esta fórmula en el que S designa metiloxi y T está ausente también se denomina mPEG.

[0062] El peso molecular de PEG para su uso según la invención es preferible que sea entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 1.000.000 Da. El peso molecular de PEG en kDa se puede indicar entre paréntesis. Por ejemplo, mPEG(30k) indica éter de monometil de poli(etileno glicol) con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Este polímero puede, por otro lado, estar compuesto por aproximadamente  $680 \pm 100$  unidades de etilenglicol. En otro ejemplo, en mPEG(4k) n es 90 y el peso molecular es 3991 Da, es decir aprox 4 kDa. Asimismo, mPEG(20k) tiene un peso molecular medio de 20 kDa y un n medio de 454.

[0063] El PEG, para su uso según la presente invención, es lineal o ramificado. En formas de realización particulares el PEG, para su uso según la invención, es a) polidisperso o b) monodisperso. En formas de realización particulares, el índice de polidispersidad de PEG para su uso según la invención está i) por debajo de 1,06, ii) por debajo de 1,05, iii) por debajo de 1,04, iv) por debajo de 1,03 o v) entre 1,02 y 1,03.

[0064] El ácido polisialílico presente en M<sup>1</sup> es preferiblemente un homopolímero de ácido N-acetilneuramínico con  $\alpha(2 \rightarrow 8)$  enlaces cetosídicos (ácido colomínico), con peso molecular de 8 a 100kD, preferiblemente de 20 a 40kD.

[0065] Los polipéptidos presentes en M<sup>1</sup> son preferiblemente proteínas plasmáticas. El término "proteína plasmática", tal y como se utiliza en este caso, se refiere a albúminas, anticuerpos y fibrinógenos, preferiblemente albúminas y anticuerpos.

[0066] El término "albúmina", tal y como se utiliza en este caso, se refiere a albúmina de suero procedente de suero sanguíneo, e incluye albúmina de suero humano así como albúmina de suero de otras fuentes. El término "albúmina", tal y como se utiliza en este caso, incluye cualquier derivado de albúmina o versiones modificadas de albúmina.

[0067] El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo quimérico. Preferiblemente es un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 (p. ej. IgG1, □), IgG3 (p. ej. IgG3, □) y IgG4 (p. ej. IgG4, □). No obstante, otros isotipos de anticuerpos también están abarcados por la invención, incluyendo IgG2, IgM, IgA1, IgA2, IgA secretor, IgD, e IgE. Los fragmentos de unión al antígeno adecuados de tales anticuerpos incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, fragmentos de Fv monocatenario o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión al antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que se fusiona a un polipéptido de región de bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH<sub>2</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región de bisagra, y (iii) una región constante CH<sub>3</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH<sub>2</sub>. Tales proteínas de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión se describen más en detalle en la US 2003/0118592 y la US 2003/0133939. Alternativamente, un fragmento puede comprender la región constante de un anticuerpo; de este modo, un fragmento puede ser un fragmento de Fc o parte del mismo.

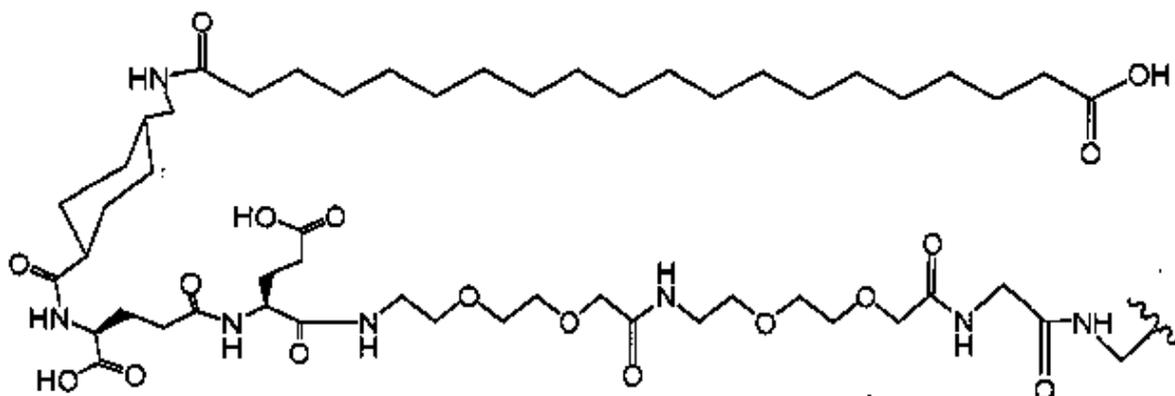
[0068] El término "ligante de proteína plasmática", tal y como se utiliza en este caso, se refiere a cualquier fracción capaz de unirse a una proteína plasmática, particularmente albúmina. Una fracción que se une a la albúmina es un "ligante de albúmina". La capacidad de un compuesto para unirse a la albúmina se puede determinar según se describe en J. Med. Chem, 43, 2000, 1986-1992, que se incorpora en este caso como referencia. En el presente contexto, un compuesto se define como unión a la albúmina si Ru/Da está por encima de 0,05, tal como por encima de 0,10, tal como por encima de 0,12 o incluso por encima de 0,15. Los ligantes de albúminas son típicamente moléculas altamente hidrofóbicas, preferiblemente derivadas de ácidos grasos. Así, un ligante de albúmina comprenderá preferiblemente una fracción de  $-(CH_2)_{12}-$ .

[0069] Una fracción preferida (M<sub>1</sub>) que comprende una fracción de PEG es:

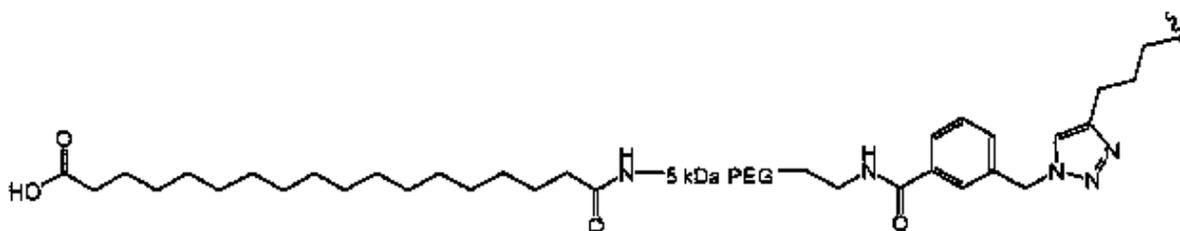


55 dónde mPEGyl es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20kDa.

[0070] Una fracción preferida (M<sub>1</sub>) que comprende un ligante de albúmina es:



[0071] Una fracción preferida ( $M_1$ ) que comprende una fracción de PEG y un ligante de albúmina es:



5

Fracciones Indicadoras ( $M^2$ )

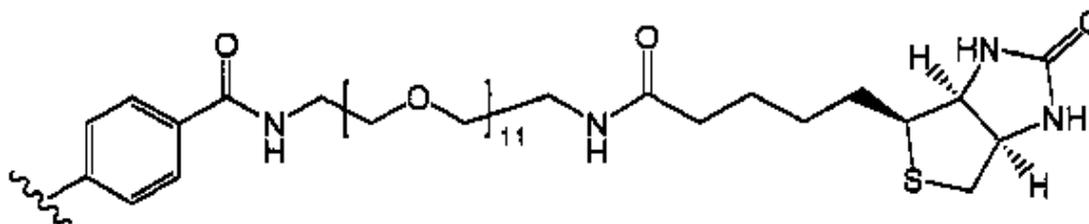
[0072] La reacción del derivado de Factor VIII de la fórmula (II) con un aldehído de la fórmula (IV) introduce una fracción M en el Factor VIII. En una forma de realización, M es una fracción indicadora ( $M^2$ ). Un derivado de Factor VIII de la fórmula (II) que porta una o más fracciones indicadoras ( $M^2$ ) tiene de forma típica sustancialmente la misma actividad que el Factor VIII humano activado. El término "sustancialmente la misma actividad que el Factor VIII humano activado" tiene el significado definido anteriormente.

[0073] Las fracciones indicadoras ( $M^2$ ) pueden comprender cualquier marcador adecuado que permita que se detecte el derivado de Factor VIII. Los expertos en la técnica conocen los marcadores adecuados, que incluyen biotina; marcadores fluorescentes tales como radicales de fluoresceína, radicales de rodamina, radicales de Texas Red®, tintes de Alexa Fluor® tales como Alex Fluor 488 y radicales de proteína de ficobili; radioisótopos, por ejemplo Cu-64, Ga67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Pb-203, At-211, Pb-212 y Bi-212 y sustratos enzimáticos, tales como radical de acetato de p-nitrofenol. Se prefieren las fracciones indicadoras que comprenden biotina o marcadores fluorescentes.

[0074] Los marcadores de biotina pueden detectarse o reconocerse fácilmente utilizando ensayos conocidos por un experto en la técnica, usando típicamente estreptavidina, por ejemplo un ensayo de ALISA. Los marcadores fluorescentes también pueden detectarse o reconocerse utilizando ensayos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo usando citometría de flujo. Los radioisótopos también se pueden detectar o reconocer utilizando ensayos conocidos por un experto en la técnica.

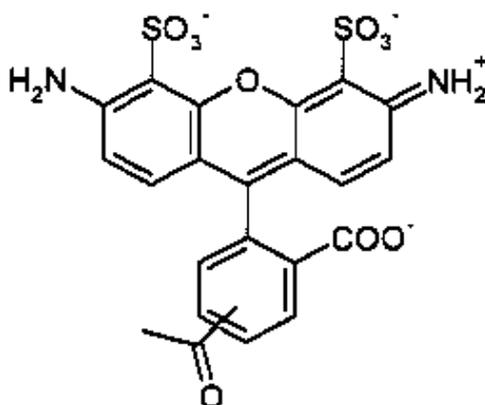
[0075] Una fracción indicadora preferida ( $M^2$ ) que comprende biotina es:

30



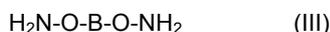
[0076] Una fracción indicadora preferida ( $M^2$ ) son los tintes de la serie Alexa disponibles comercialmente en Invitrogen. De los mismos, un tinte preferido es Alexa 488. Diferentes reactivos para la fijación de Alexa 488 están disponibles comercialmente en Invitrogen. Este tinte se puede detectar fácilmente con su fluorescencia, que se puede observar a una excitación de 495 nm y una emisión de 519 nm. La estructura general de Alexa 488 es:

35



#### Reactivos de dihidroxilamina

5 [0077] Los compuestos de dihidroxilamina usados en la presente invención son compuestos de la fórmula (III):



10 donde B representa un alquileo de C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>. Dicho alquileo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> es un alquileo ramificado o lineal, preferiblemente lineal. B representa típicamente un alquileo C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub>, preferiblemente un alquileo C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub>. B preferiblemente es un grupo de n-etileno, n-propileno o n-butileno, de la forma más preferible, un grupo de n-propileno. Así, un compuesto preferido de dihidroxilamina es 1,3- diaminoxipropano.

15 [0078] Los compuestos de dihidroxilamina de la fórmula (III) se obtienen fácilmente a partir de reactivos disponibles comercialmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por analogía con métodos conocidos.

#### Composiciones farmacéuticas

20 [0079] La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado de Factor VIII de la fórmula (I). Típicamente, dicha composición farmacéutica comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 [0080] Un portadores o diluyente farmacéuticamente aceptable preferido es una solución acuosa tamponada. Así, la presente invención se refiere a una fórmula farmacéutica que comprende una solución acuosa de un derivado de Factor VIII y un tampón, donde el derivado de Factor VIII está presente en una concentración de 0,01 mg/ml o superior, y donde dicha fórmula tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

30 [0081] Típicamente, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas derivadas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

35 [0082] Típicamente, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización de la invención el conservante se selecciona del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p- clorofenoxipropano-1,2-diol) o mezclas derivadas. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por  
45 conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

50 [0083] Típicamente, la fórmula comprende además un agente isotónico. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico se selecciona del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanediol (propilenglicol), 1,3-propanediol, 1,3-butanediol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Se puede utilizar cualquier azúcar, tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano,

pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na. En una forma de realización el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> con al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una forma de realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados anteriormente se pueden utilizar individualmente o combinados. No hay un límite establecido para la cantidad usada, siempre y cuando el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes que se obtienen utilizando los métodos de la invención. En una forma de realización, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes específicos isotónicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0084] Típicamente, la formulación comprende además un agente quelante. En otra forma de realización de la invención el agente quelante se selecciona de: sales de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico y sus mezclas derivadas. En otra forma de realización de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0085] Típicamente, la formulación comprende además un estabilizador. El uso de un estabilizador en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0086] Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además una cantidad suficiente de una base de aminoácidos para reducir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácidos" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente bien en su forma de base libre bien en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal o algunos pueden estar presentes en su forma de base libre mientras que otros están presentes en su forma de sal. En una forma de realización, los aminoácidos que se pueden usar para preparar las composiciones de la invención son los que portan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D o DL) de un aminoácido particular (p. ej. glicina, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas derivadas) o combinaciones de estos estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención mientras que el aminoácido particular esté presente ya sea en su forma de base libre o su forma de sal. En una forma de realización se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se puede formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido de origen natural que provoca el efecto deseado de disminución de formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina o nitina y N-monoetil L-arginina, los análogos de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los análogos de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan a las composiciones en su forma de base libre o su forma de sal. En otra forma de realización de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración que es suficiente para prevenir o retardar la agregación de la proteína.

[0087] En otra forma de realización de la invención, se puede agregar metionina (u otros aminoácidos sulfúricos o análogo de aminoácidos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un residuo de metionina susceptible de tal oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina a lo largo del tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina produce una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Se puede usar cualquier estereoisómero de metionina (isómero L, D o DL) o combinaciones de los mismos. La cantidad que hay que añadir debería ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de manera que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. En general, esto se puede conseguir añadiendo metionina de manera que la proporción de metionina añadida a los residuos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

[0088] Típicamente, la formulación comprende además un estabilizador seleccionado del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En otra forma de realización de la invención el estabilizador se selecciona de polietilenglicol (p. ej. PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi/hidroxixelulosa o derivados de los mismo (p. ej. HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre tales como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol y diferentes sales (p. ej. cloruro sódico). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0089] Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que además potencian la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo de las mismas. Los agentes estabilizantes de interés particular para la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido frente a la oxidación de metionina, y un surfactante no iónico, que protege el polipeptídico frente a la agregación asociada a la liofilización o cizalladura mecánica.

[0090] En otra forma de realización de la invención, la formulación comprende un surfactante. El surfactante puede ser un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros en bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Tritón X-100), ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno, polioxietileno y derivados de polietileno tales como derivados alcoxilados y alquilados (tweens, por ejemplo Tween-20; Tween-40; Tween-80 y Brij-35), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, serina de fosfatidilo, colina de fosfatidilo, etanolamina de fosfatidilo, inositol de fosfatidilo, glicerol de difosfatidil y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil-fosfatídico) y liso-fosfolípidos (por ejemplo, palmitoil-lisofosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquilo, alcoxilo (éster alquilico), derivados alcoxi (alquilo éter) de lisofosfatidilo y fosfatidilcolinas, por ejemplo derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir, colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol y los de carga positiva DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosidos), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (p. ej. taurodihidrofusidato de sodio etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales derivadas C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N<sup>o</sup>-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina o histidina, o derivados acilados de cadena lateral de lisina o arginina, derivados N<sup>o</sup>-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado de N<sup>o</sup>-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, registro CAS n°: [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS n°: [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS n°: [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), caprilato sódico, ácido cólico o derivados de los mismos, ácidos biliares y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, deoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos de ión híbrido (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonatos, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio) tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil beta-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic), que son copolímeros en bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0091] El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0092] En la fórmula farmacéutica de la presente invención pueden estar presentes otros ingredientes. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes de humidificación, emulsionantes, antioxidantes, agentes de carga, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un ión híbrido (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad total de la fórmula farmacéutica de la presente invención.

[0093] En una forma de realización, el derivado de Factor VIII es en forma seca, a la que el médico o el paciente añade solventes y/o diluyentes antes de usarla. Por "forma seca" se entiende que la composición o fórmula líquida farmacéutica se seca bien por criodesecación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), por atomización (véase Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

65 Utilidad terapéutica

5 [0094] Los derivados de Factor VIII de la presente invención son terapéuticamente útiles, típicamente en el tratamiento del trastorno hereditario de la sangre hemofilia A (hemofilia clásica). La hemofilia A está causada por una deficiencia relacionada con el cromosoma X del Factor VIII de coagulación sanguínea y afecta casi exclusivamente al sexo masculino, con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. La manifestación clínica de la hemofilia A es una tendencia al sangrado aumentada.

10 [0095] Los derivados de Factor VIII de la invención pueden, por lo tanto, utilizarse para aliviar los síntomas asociados a la hemofilia A, o detener la progresión o empeoramiento de dichos síntomas. Típicamente, el tratamiento se refiere a una reducción en la tendencia a sangrar de un paciente que tiene hemofilia A.

15 [0096] Los métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de Factor VIII o composición farmacéutica de la invención a un paciente con hemofilia A. Como se utiliza en este caso, "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye las cantidades que reducen la tendencia a sangrar de un paciente con hemofilia A. La cantidad debería, de este modo, ser suficiente para causar una reducción detectable de la gravedad del trastorno, lo que típicamente supone una reducción de la tendencia a sangrar. Preferiblemente los derivados de Factor VIII de la invención se administran como parte de un régimen de dosificación semanal.

20 [0097] Los derivados de Factor VIII de la invención se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación. Así, se pueden administrar parenteralmente, ya sea por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o por técnicas de infusión. Los derivados de Factor VIII también se puede administrar por pulverización pulmonar o nasal, utilizando una solución o suspensión del derivado de Factor VIII en forma de pulverización pulmonar o nasal. La administración transdérmica incluye la inyección sin aguja o el uso de un parche, tal como un parche iontoforético.

25 [0098] Una dosis típica es de aproximadamente 15-100 U por kg de peso corporal, preferiblemente aproximadamente 20-75 U por kg de peso corporal, más preferiblemente aproximadamente 25-50 U por kg de peso corporal y de la forma más preferible de aproximadamente 30-40 U por kg de peso corporal, según la actividad del compuesto específico, la edad, el peso y las condiciones del sujeto que se va a tratar, el tipo y gravedad de la enfermedad y la frecuencia y forma de administración.

30 [0099] La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos:

#### Ejemplos

35 [0100] Las siguientes soluciones tampón se prepararon y usaron para la preparación de los productos Intermedios y los Ejemplos:

40 - tampón A: 20mM de tampón de imidazol pH 7.3 conteniendo 10mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80, 1M de glicerol y 0,15M de NaCl;

- tampón B: 20mM de tampón de imidazol pH 7.3 conteniendo 10mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol y 0,5M de NaCl;

45 - tampón C: 20mM de tampón de imidazol pH 7.3 conteniendo 10mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol;

- tampón D: 20mM de tampón de imidazol pH 7.3 conteniendo 10mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80, 1 M de glicerol y 1 M de NaCl.

50 - tampón E: 100mM de tampón de imidazol pH 6.5 conteniendo 0,02% de Tween 80, 10% v/v de glicerol, 10mM de CaCl<sub>2</sub>;

- tampón F: 5% (p/v) de hidroxipropilo β-ciclodextrina; y

55 - tampón G: 100mM de tampón de imidazol pH 6.5 conteniendo 0,02% de Tween 80, 10% v/v de glicerol, 0,15M de NaCl, 10mM de CaCl<sub>2</sub>.

Intermedio 1: 1,3-Diaminoxipropano

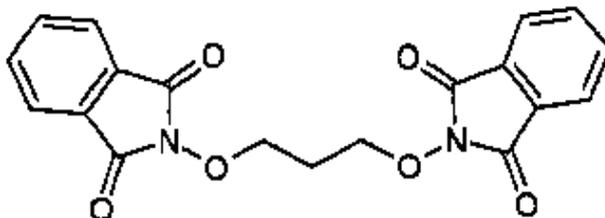
60 [0101]



[0102] Se agregó 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno (7,9 ml, 53 mmol) gota a gota a una solución de hidroxitalimida (8,68 g, 53 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml). Se agregó 1,3-Dibromopropano (2,7 g, 26 mmol). La solución se

agitó a 85 °C durante 1 hora. Se enfrió a temperatura ambiente y se vertió sobre hielo (200 ml). La mezcla fue agitada. El precipitado formado se aisló por filtración y se lavó con agua fría (50 ml) y acetonitrilo frío (50 ml). El producto bruto se recristalizó a partir de butanol (150 ml) y se secó para dar 2,67 g de 1,3-bis-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)propano.

5



[0103]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\square$  2,22 (quinteto, 2 H); 4,51 (t, 4 H); 7,75 (m, 4 H); 7,82 (m, 2 H).

10

[0104] Una mezcla de 1,3-bis-(1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-iloxi)propano (2,5 g, 6,8 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (10 ml) y ácido acético (15 ml) se agitó a 115°C durante 3 h. Los solventes se eliminaron *in vacuo*. Se añadió agua (15 ml). La precipitación se aisló por filtración. Se lavó con 6 M de ácido clorhídrico (15 ml). El producto bruto se recristalizó a partir de etanol para dar 480 mg de la sal de hidrocioruro de 1,3-diaminoxipropano.

15

[0105]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\square$  2,05 (quinteto, 2 H); 4,13 (t, 4 H).

Intermedio 2: transaminación de Factor VIII con Intermedio 1 para dar Factor VIII de  $\text{N}^{\text{Gln}}$ -(3-aminoxi propiloxi)

20

[0106] Se proporcionó transglutaminasa microbiana (TGase) de *Streptovercillium mobaraense* (de Ajinomoto) como polvo con 1% p/p de proteína. Se hizo una solución (11,4 $\mu\text{M}$ ) en el tampón A.

25

[0107] Se agregó a la solución del tampón A (11,67 ml) una solución de un compuesto de Factor VIII con el dominio B eliminado a la que se agregó un péptido con la secuencia SFSQNSRHPSQNPVLRHQR fijado al C-término de la cadena pesada en el tampón B (5,4 mg/ml; 400  $\mu\text{l}$ ), seguido de la adición de una solución de 1,3-diaminoxipropano (Intermedio 1) en el tampón A (55 mg/ml, 6,97 ml). La reacción se inició por adición de la solución de la enzima TGase (11,4  $\mu\text{M}$ , 950  $\mu\text{l}$ ). La mezcla reactiva se incubó a 27°C durante 4 horas. La reacción se detuvo por adición de una solución de N-Etilmaleimida (15,6 mg/ml en el tampón A, 86 $\mu\text{l}$ ) e incubación durante 10 min a 27°C.

30

[0108] El producto se purificó por intercambio iónico de la siguiente manera. La mezcla reactiva se diluyó en el tampón C (104ml) y se aplicó en dos dispositivos Vivapure Q Maxi M de intercambio iónico (número de producto de VivaScience VS-IX20QM08, VivaScience AG, Alemania) que previamente se habían equilibrado con el tampón C. Después de dos fases de lavado con el mismo tampón, el producto de reacción se eluyó con el tampón de elución D (19ml por dispositivo). El eluato resultante se sobreconcentró por ultrafiltración en dispositivos Amicon Ultra (corte 50kDa) (Millipore Corp., EEUU) hasta 1,3ml.

35

[0109] La concentración de proteína se estimó por medición de absorción en 280nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}=14,6$  Lg-1cm-1) (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, EEUU) dando una recuperación de proteína estimada de 97%.

40

[0110] El producto (Intermedio 2) se usó como tal en las fases posteriores.

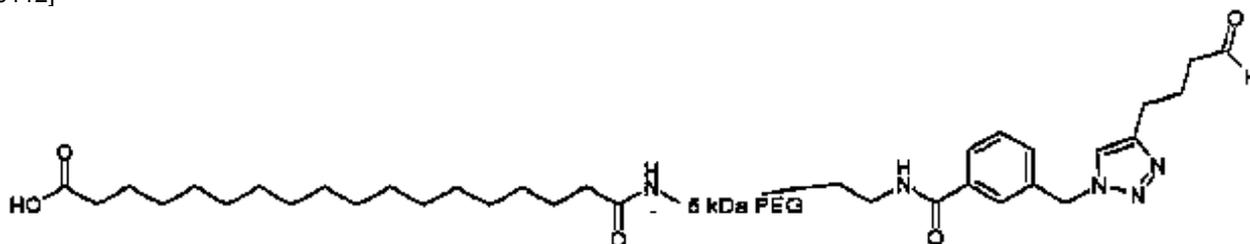
Productos intermedios 3 a 7: preparación de aldehídos

45

[0111] Se prepararon productos intermedios de aldehído utilizando la síntesis multifase como se explica a continuación.

Intermedio 3: 7-((omega-(2-(3-((4-(3-Formilpropil)-1,2,3-triazol-1-yl)metil) benzoilamino)etil)5 kDa PEGyl) carbamoil)ácido heptadecanóico

[0112]

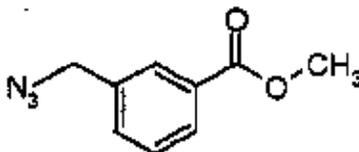


50

[0113] El Intermedio 3 contiene un grupo de PEG y un ligante de albúmina  $-(CH_2)_{12}-$

Fase 1: metilo 3-(azidometil)benzoato

5 [0114]



10 [0115] Se agregó azida sódica (5,68 g, 87 mmol) a una solución de metilo 3-(bromometil)benzoato (5,00 g, 22 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml). Se agregó yoduro de tetrabutamonio (81 mg, 0.22 mmol). La mezcla reactiva se calentó a 60°C durante 16 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y vertió sobre agua (200 ml). Esta mezcla se extrajo con acetato de etilo (400 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 200 ml) y se secó sucesivamente sobre sulfato de sodio. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar 4,11 g de metilo 3-(azidometil)benzoato crudo, que se usó sin purificación adicional.

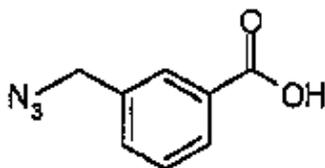
15 [0116] MS:  $m/z = 192$ .

[0117]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,92 (s, 3 H); 4,40 (s, 2 H); 7,50 (m, 2 H); 8,00 (m, 2 H).

Fase 2: 3-(Azidometil)ácido benzoico

20

[0118]



25 [0119] Una solución de hidróxido de litio (3,81 g, 21,5 mmol) en agua (25 ml) se agregó a una solución de metilo 3-(azidometil)benzoato crudo (4,11 g, 21,5 mmol) en 1,4-dioxano (25 ml). Se agregó agua y 1,4-dioxano hasta que se obtuvo una solución clara. La mezcla reactiva se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Se añadió 1M de solución acuosa de hidróxido sódico (100 ml). La mezcla reactiva se lavó con éter metil tert-butílico (2 x 100 ml). La fase acuosa se acidificó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio. Se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las fases de acetato de etilo combinadas se secaron sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar 3,68 g de 3-(azidometil)ácido benzoico crudo, que se usó sin purificación adicional.

30

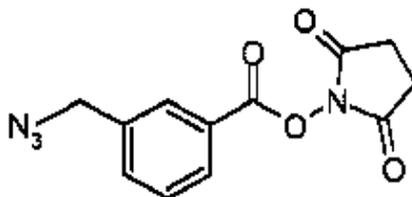
[0120] MS:  $m/z = 150$

[0121]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4,57 (s, 3 H); 7,55 (m, 2 H); 8,00 (m, 2 H); 13,10 (br, 1 H).

35

Fase 3: Pirrolidina-2,5-diona-1-il-3-(azidometil)éster benzoico

[0122]



40

[0123] 2-Succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU, 32, 52 g, 107 mmol) se añadió a una solución de 3-(azidometil)ácido benzoico (19,01 g, 107 mmol) y trietilamina (14,96 ml, 107 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Se diluyó con acetato de etilo (250 ml) y se lavó con agua (3 x 120 ml). La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (150 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar 25,22 g de pirrolidina-2,5-diona-1-il-3-(azidometil)éster benzoico.

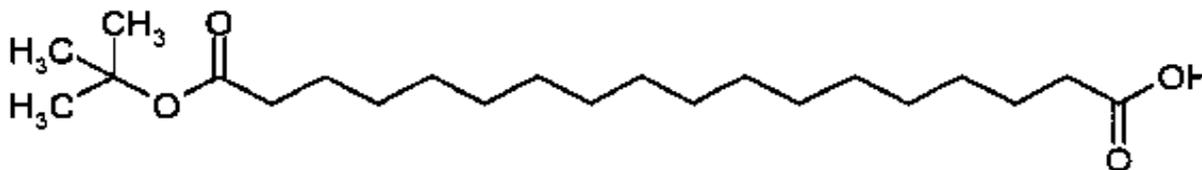
45

[0124]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,92 (m, 4 H); 4,45 (s, 2 H); 7,55 (t, 1 H); 7,65 (d, 2 H); 8,10 (m, 2 H).

50

Fase 4: éster mono-tert-butílico de ácido octadecanodioico

[0125]



5

[0126] Se añadió N,N-dimetilformamida di-tert-butilacetal (35,2 ml, 147 mmol) gota a gota a una solución de ácido octadecanodioico (15,4 g, 49,0 mmol) en tolueno (250 ml) que se mantuvo a 95 °C. La mezcla reactiva se mantuvo a 95 °C durante 16 horas. Se enfrió a temperatura ambiente. El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (150 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (150 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (85 ml). El material insoluble se eliminó por filtración. El solvente se eliminó *in vacuo* del filtrado. El residuo se disolvió en diclorometano (18 ml). Se agregó heptano (180 ml). La precipitación formada se eliminó por filtración. El solvente se eliminó *in vacuo*. Se agregó heptano (150 ml). Se formó una precipitación. Ésta se aisló por filtración y se secó *in vacuo*. El solvente se eliminó *in vacuo* del agua madre. El sólido formado se aisló por filtración y se secó *in vacuo*. Los dos lotes de sólidos aislados se combinaron y disolvieron en la cantidad más pequeña posible de diclorometano refluente. La solución se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió heptano (10 veces el volumen de diclorometano). La mezcla se mantuvo a 0 °C. La precipitación formada se aisló por filtración, se lavó con heptano (30 ml) y se secó *in vacuo* para dar 4,19 g de éster mono-tert-butílico de ácido octadecanodioico.

10

15

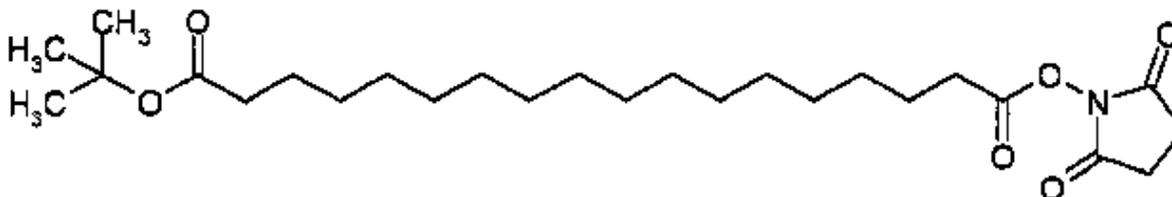
20

[0127]  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\square$  1,23 (m, 24 H); 1,39 (s, 9 H); 1,47 (m, 4 H); 2,16 (m, 4 H).

Fase 5: éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de éster tert-butílico de ácido octadecanodioico

25

[0128]



30

[0129] 2-Succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU, 378 mg, 0,71 mmol) se añadió a una solución de éster mono-tert-butílico de ácido octadecanodioico (300 mg, 0,64 mmol) en diclorometano (10 ml). Etildiisopropilamina (0,152 ml, 0,71 mmol) se añadió a la mezcla reactiva. Se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Se lavó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (2 x 10 ml), con una solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (10 ml) y finalmente con solución salina (10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de éster tert-butílico de ácido octadecanodioico, que se usó sin purificación adicional.

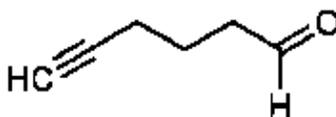
35

[0130]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\square$  1,20-1,65 (m, 26 H); 1,44 (s, 9 H); 1,74 (quinteto, 2 H); 2,20 (t, 2 H); 2,60 (t, 2 H); 2,84 (m, 4 H).

40

Fase 6: Hex-5-inal

[0131]



45

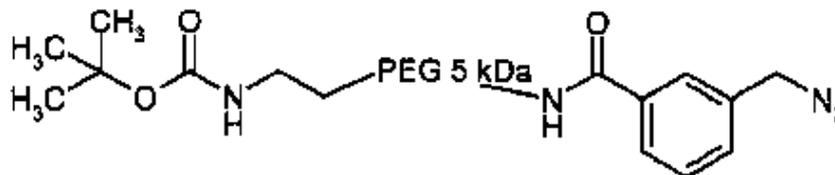
[0132] Una solución de dimetilsulfóxido (0,13 ml, 2 mmol) se enfrió a -78°C. Una solución de cloruro de oxalilo (0,12 ml, 1,38 mmol) en diclorometano (1 ml) se añadió a esta solución. La mezcla se agitó a -78°C durante 20 min. Una solución de hex-5-in-1-ol (0,10 ml, 0,922 mmol) en diclorometano (0,5 ml) se añadió a esta solución. Se agitó durante 20 min a -78 °C. Se añadió trietilamina (0,51 ml, 3,69 mmol). La mezcla reactiva se agitó a -78 °C durante 10 min. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente. Se diluyó con acetato de etilo (40 ml) y se lavó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (2 x 20 ml). La capa orgánica se lavó con solución salina (20 ml) y se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar hex-5-inal.

50

[0133]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\square$  1,86 (quinteto, 2 H); 2,27 (t, 2 H); 2,62 (t, 2 H), 9,81 (s, 1 H).

Fase 7: 3-(Azidometil)-N-(omega-(2-(tert-Butoxicarbonilamino)etil) 5 kDa PE-Gyl)amida benzoica

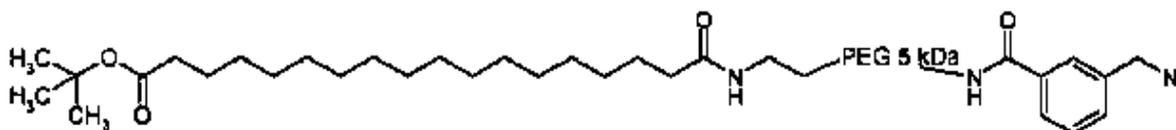
5 [0134]



[0135] Pirrolidina-2,5-diona-1-il 3-(azidometil)éster benzoico (64 mg, 0,234 mmol) y etildiisopropilamina (0,10 ml, 0,585 mmol) se adicionaron posteriormente a una solución de tert-butilo 2-(omega-(amino)5 kDa PEGyl)etilcarbamoato disponible comercialmente (p. ej. Rapp, 1,00 g, 0,195 mmol). La mezcla reactiva se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. El solvente se eliminó *in vacuo*. Se añadió éter (20 ml). La precipitación formada se aisló por filtración y se secó *in vacuo* para dar 3-(azidometil)-N-(omega-(2-(tert-Butoxicarbonilamino)etil) 5 kDa PEGyl)amida benzoica. El  $^1\text{H-NMR}$  en  $\text{CDCl}_3$  cumplió la expectativa.

15 Fase 8: tert-butilo 17-(2-(omega-(3-(azidometil)benzoilamino)5 kDa PE-Gyl)etilcarbamoil)heptadecanoato

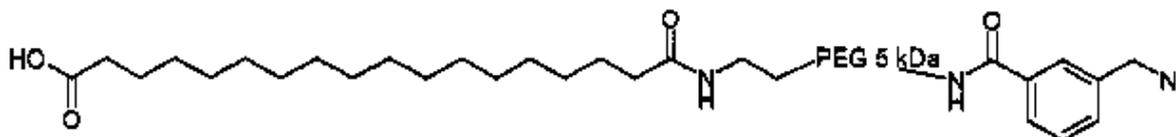
[0136]



20 [0137] Se agregó ácido trifluoroacético (5 ml) a una solución de 3-(azidometil)-N-(omega-(2-(tert-butoxicarbonilamino)etil) 5 kDa PEGyl)amida benzoica (1,03 g, 0,19 mmol) en diclorometano (5 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (10 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo fue disuelto en el diclorometano (10 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (10 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (10 ml). Una solución de éster 2,5- dioxopirrolidin-1-ílico de éster tert-butílico de ácido octadecanodioico (90 mg, 0,243 mmol) en diclorometano (5 ml) y etildiisopropilamina (0,83 ml, 4,86 mmol) se agregaron posteriormente. La mezcla reactiva se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se diluyó con diclorometano (40 ml) y se lavó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (2 x 30 ml) y solución salina (30 ml). La solución se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo*. El aceite restante se trató con éter (30 ml). El sólido formado se aisló por filtración. Se lavó con éter (10 ml) y se secó *in vacuo* para dar 783 mg de tert-butilo 17-(2-(omega-(3-(azidometil)benzoilamino)5 kDa PE-Gyl)etilcarbamoil) heptadecanoato.  $^1\text{H-NMR}$  en  $\text{CDCl}_3$  cumplió la expectativa.

35 Fase 9: 17-(2-(omega-(3-(Azidometil)benzoilamino)5 kDa PE-Gyl)etilcarbamoil)ácido heptadecanóico

[0138]



40 [0139] Se añadió ácido trifluoroacético (5 ml) a una solución de tert-butilo 17-(2-(omega-(3-(azidometil)benzoilamino) 5 kDa PEGyl)etilcarbamoil)heptadecanoato (500 mg, 0,09 mmol) en diclorometano (5 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se disolvió en diclorometano (25 ml). Se lavó posteriormente con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio (25 ml) y solución salina (25 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo* para dar 17-(2-(omega-(3-(azidometil)benzoilamino)5 kDa PEGyl)etilcarbamoil)ácido heptadecanóico.

Fase 10: 17-((omega-(2-(3-((4-(3-Formilpropil)-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzoilamino)etil)5 kDa PEGyl)carbamoil)ácido heptadecanóico(Intermedio 3)

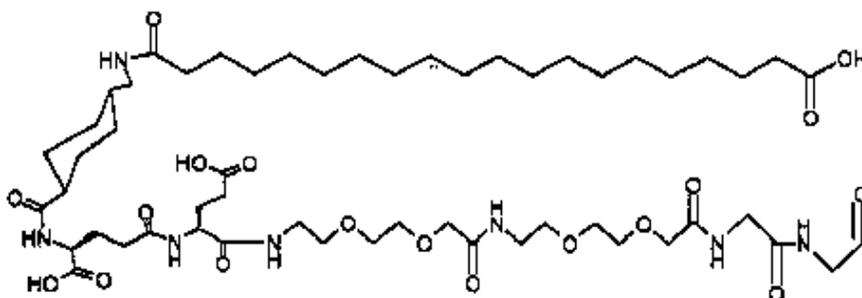
50 [0140] 17-(2-(omega-(3-(Azidometil)benzoilamino)5 kDa PE-Gyl)etilcarbamoil)ácido heptadecanóico (200 mg, 0,036 mmol) se disolvió en un tampón consistiendo en 2% 2,6-lutidina en agua (3,5 ml). Una solución de hex-5-inal (70 mg, 0,725 mmol) se agregó a etanol (0,5 ml). Una solución de pentahidrato de sulfato de cobre (II) (180 mg) en agua (2,50

ml) se añadió a una solución de ácido ascórbico (638 mg, 3,626 mmol) en una mezcla de agua (2,5 ml) y 2,6-lutidina (0,125 ml). Esta solución se mantuvo durante 45 segundos a temperatura ambiente antes de añadirla a la solución de 17-(2-(omega-(3- (azidometil)benzoilamino)5 kDa PEGyl)etilcarbamoil)ácido heptadecanóico y hexinal. La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se diluyó con agua (25 ml) y se extrajo con diclorometano (2 x 100 ml). La fase de diclorometano se lavó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (2 x 100 ml) y solución salina (100 ml). Se secó sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo*. Se agregó éter (30 ml). La precipitación formada se aisló por filtración. Se disolvió en 50 mM de solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio (5 ml) filtrada y sometida a una cromatografía de gel utilizando una columna de desalación HiPrep 26/10 (GE Healthcare) y un tampón de 50 mM de hidrogenocarbonato de amonio. Las fracciones que contenían el material deseado fueron agrupadas y liofilizadas para dar 17-((omega-(2-(3-((4-(3-formilpropil)-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzoilamino)etil)5 kDa PEGyl)carbamoil)ácido heptadecanóico (Intermedio 3).

[0141] El análisis  $^1\text{H-NMR}$  mostró aproximadamente 10% del aldehído que se esperaba (Intermedio 3).

15 Intermedio 4: 19-(((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(2-(1-(formilmetilcarbamoil)-metilcarbamoil)metoxi)etoxi)etilcarbamoil)metoxi)etoxi)etilcarbamoil)-3-carboxipropilcarbamoil)-1-carboxipropilcarbamoil)-ciclohexil)metil)carbamoil)ácido nonadecanoico

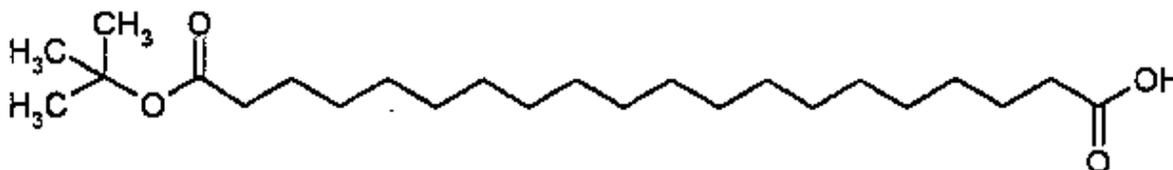
[0142]



20

Fase 1: éster mono-tert-butílico de ácido icosanedioico

25 [0143]



30 [0144] Se disolvió ácido icosanedioico (10 g, 29 mmol) en tolueno a 115°C. La solución se mantuvo a esta temperatura, mientras se añadió gota a gota N,N-dimetilformamida di-tert-butilacetal más de 1 h. La mezcla reactiva se agitó a 115°C durante 16 h. Se enfrió a 0 °C. La precipitación formada se eliminó por filtración. El solvente se eliminó del filtrado para dar 7,49 g de éster mono-tert-butílico de ácido icosanedioico.

35 [0145]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,25 (m, 28 H); 1,44 (s, 9 H); 1,59 (m, 4 H); 2,20 (t, 2 H); 2,34 (t, 2 H).

Fase 2: 19-(((trans-4-((S)-3-((S)-1-(2-(2-((2-(((2,2-di-metoxietilcarbamoil)-metilcarbamoil)metoxi)etoxi)etilcarbamoil)metoxi)etoxi)etilcarbamoil)-3-carboxipropilcarbamoil)-1-carboxipropilcarbamoil)ciclohexil)metil)carbamoil) ácido no-  
adecanoico

40 [0146]



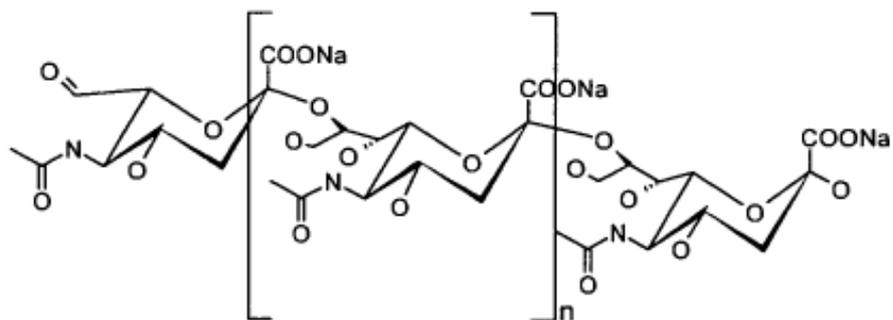












(n es aproximadamente 70)

Fase 1: fraccionamiento de ácido colomínico

5 [0190] El ácido colomínico usado fue el compuesto comercial de Sigma-Aldrich (sal de sodio). Para obtener un material más homogéneo (con relación a su peso molecular) se fraccionó en una columna de intercambio iónico según la WO 2008/074032. La fracción correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 20kD se usó en los experimentos posteriores.

10 Fase 2: oxidación de peryodato de sodio de ácido colomínico de 20kD:

[0191] A una solución de 20kD de ácido colomínico (obtenida según la fase 1 (40mg en 2,24ml de H<sub>2</sub>O) se le agregó una solución de peryodato de sodio (0,96mg en 2,244ml de H<sub>2</sub>O).

15 [0192] La reacción se incubó durante 15min a 23°C a oscuras.

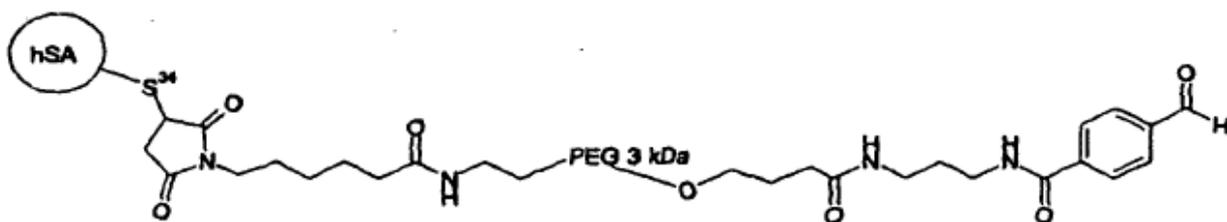
[0193] El exceso de peryodato se aplacó por 3-metilio-1-propanol (4,7μl). La reacción se incubó más durante 2h a 23°C.

20 [0194] Los reactivos se eliminaron por ultrafiltración en el filtro Millipore Ultra, corte de 5kD. Se hicieron varios ciclos de dilución en agua.

[0195] El material resultante fue liofilizado.

Intermedio 9:

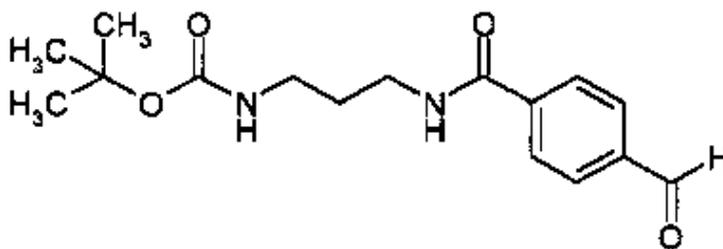
25 [0196] C<sup>34</sup>-(1-(5-(2-(ω-(3-(4-(formil)benzoilamino)propil)carbamoilmetil)3 kDa PEGyl)-etilcarbamoil)pentil) 2,5-dioxopirrolidin-3-il)albúmina



Fase 1:

30 N-[3-(tert-Butoxicarbonilamino)propil]-4-formilbenzamida

[0197]



[0198] Se agregó éster 2,5-dioxopyrrolidin-1-ílico de ácido 4-formilbenzoico (1,56 g, 6,31 mmol) a una solución del disponible comercialmente éster tert-butílico de ácido 3-aminopropilcarbámico (1,10 ml, 6,31 mmol) y etildiisopropilamina (2,16 ml, 12,62 mmol) en diclorometano (25 ml). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se agregó diclorometano (100 ml). La mezcla se lavó con un 10% de solución acuosa de hidrogenosulfato de sodio (70 ml). La fase acuosa se extrajo con diclorometano (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución salina (100 ml) y se secaron sobre sulfato magnésico. El solvente se eliminó *in vacuo*. El material se purificó por cromatografía rápida en sílice (90 g), utilizando una mezcla de acetato/heptano de etilo (3:1) como eluyente para dar 1,05 g de N-[3-(tert-butoxycarbonylamino)propil]-4-formilbenzamida.

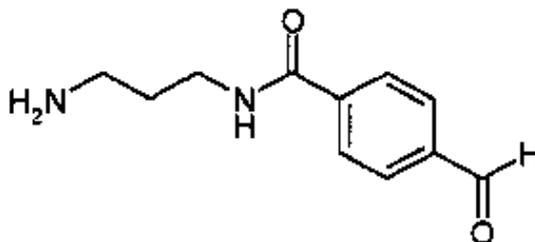
[0199] MS:  $m/z = 329$ , requerido para  $[M+Na]^+$ : 329.

[0200]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,46 (s, 9 H); 1,75 (quinteto, 2 H); 3,28 (t, 2 H); 3,54 (t, 2 H); 4,84 (br, 1 H); 7,60 (br, 1 H); 7,96 (d, 2 H); 8,03 (d, 2 H); 10,09 (s, 1 H).

Fase 2:

N-[3-Aminopropil]-4-formilbenzamida

[0201]



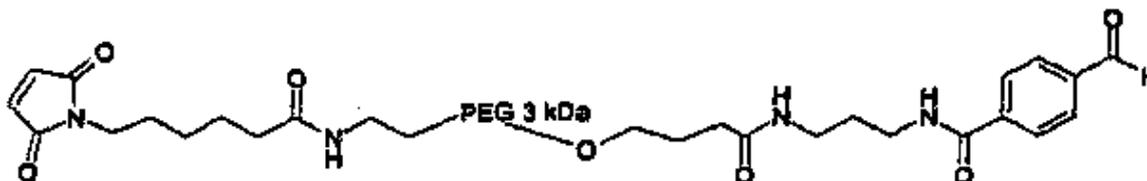
[0202] Se agregó ácido trifluoroacético (10 ml) a una solución de N-[3-(tert-butoxycarbonylamino)propil]-4-formilbenzamida (1,1 g, 3,43 mmol) en diclorometano (10 ml). La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se redisolvió en diclorometano (50 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se redisolvió en diclorometano (50 ml). El solvente se eliminó *in vacuo*. El residuo se redisolvió en diclorometano (50 ml). El solvente se eliminó *in vacuo* para dar 1,76 g de la sal de trifluoroacetato de N-[3-Aminopropil]-4-formilbenzamida.

[0203]  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,46 (s, 9 H); 2,07 (br, 2 H); 3,71 (q, 2 H); 4,20 (br, 2 H); 7,95 (d, 2 H); 8,01 (d, 2 H); 10,11 (s, 1 H).

Fase 3:

N-(3-( $\omega$ -(2-(5-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)hexanoilamino)etil)3 kDa PEGylacetilamino)propil)-4-formilbenzamida

[0204]



[0205] Se agregó sal de trifluoroacetato de N-[3-Aminopropil]-4-formilbenzamida (57 mg, 0,178 mmol) a una solución disponible comercialmente (p. ej. Rapp Polymere GmbH, Alemania) ( $\omega$ -(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)hexanoilamino)etil)3 kDa PEGil)éster 2,5-dioxopyrrolidin-1-ílico de ácido acético (500 mg, 0,149 mmol) en diclorometano

(4 ml). Se agregó etilidipropilamina (0,893 ml, 5,25 mmol). Se controló el pH para que fuera de aproximadamente pH 10-11 usando una tira de pH. La mezcla reactiva se agitó durante 1h. Se añadió éter (70 ml). La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 1 h para dejar que el precipitado formado se añejara. El precipitado se aisló por filtración. Se resuspendió en el éter (50 ml). El precipitado se aisló por filtración para dar 475 mg de *N*-(3-( $\omega$ -(2-(5-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)hexanoilamino)etil)3 kDa PEGylacetilamino)propil)-4-formilbenzamida. De acuerdo con las expectativas para el producto deseado, el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  en  $\text{CDCl}_3$  mostró la presencia de un grupo de maleimida al igual que un anillo aromático parasustituido y un grupo de aldehído.

Fase 4:

[0206] Una solución de *N*-(3-( $\omega$ -(2-(5-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)hexanoilamino)etil)3 kDa PEGylacetilamino) propil)-4-formilbenzamida (1,6 mg, 452 nmol) en un tampón (1,6 ml) que consistía en 25 mM de HEPES que se ajustó a pH 7,00 por adición de hidróxido sódico 1 N se agregó a una solución de albúmina de suero humano recombinante (hSA, 15 mg, 226 nmol) con cisteína libre en un tampón (13,4 ml) que consistía en 25 mM de HEPES ajustado a pH 7,00 por adición de hidróxido sódico 1 N. La mezcla reactiva se agitó suavemente a 300 r.p.m. a 20-22 °C durante 16 h. El material se colocó en un dispositivo de ultracentrifugado de Amicon con un corte de 10 kDa. Se agregó un tampón (15 ml) que consistía en 25 mM de TRIS ajustado a pH 8,00 por adición de ácido clorhídrico 1 N. Esta solución se sometió a un centrifugado a 4000 r.p.m. durante 10 min. Se agregó un tampón (15 ml) que consistía en 25 mM de TRIS ajustado a pH 8,00 por adición de ácido clorhídrico 1 N. Esta solución se sometió a un centrifugado a 4000 r.p.m. durante 10 min. El material se sometió a una cromatografía de intercambio de anión en una columna MonoQ con un tamaño de lecho de aprox. 8 ml usando un gradiente de 0-75% de un tampón que consistía en 25 mM de TRIS y 2 M de NaCl ajustado a pH 8,00 en un tampón que consistía en 25 mM de TRIS ajustado a pH 8,00 sobre 30 CV a un flujo de 4 ml/min. La aplicación de la muestra a la columna se hizo con un flujo de 0,5 ml/min. Las fracciones que contenían material con análisis SDS-PAGE según  $\text{C}^{34}$ -(1-(5-(2-( $\omega$ -(3-(4-(formil)benzoilamino)propilcarbamoilmetil)3 kDa PEGyl)etilcarbamoil)pentil)2,5-dioxopirrolidin-3-il)albúmina fueron combinadas. Las fracciones combinadas se sometieron a una cromatografía de exclusión por tamaño usando 53 ml de un material Superdex G25 y un tampón de 25 mM de hidrogenocarbonato de amonio a un flujo de 7 ml/min. Las fracciones con material cuyo análisis SDS-PAGE era conforme a  $\text{C}^{34}$ -(1-(5-(2-( $\omega$ -(3-(4-(formil)benzoilamino)propilcarbamoilmetil)3 kDa PEGyl)etilcarbamoil)pentil)2,5-dioxopirrolidin-3-il)albúmina fueron recogidas, combinadas y sometidas a liofilización para dar 0,803 mg del compuesto del título. El rendimiento se determinó en un aparato de fotometría de Nanodrop a 280 nm usando una absorbancia molar de 4,11.

Reacción de  $\text{N}^{\text{Gln}}$ -(3-aminoxi propiloxi) Factor VIII (producto Intermedio 2) con aldehídos (productos intermedios 3, 4, 5, 6, 7,8 y 9)

[0207] El producto Intermedio 2, tal y como se preparó anteriormente, se reaccionó con varios aldehídos en reacciones de oximación, para formar derivados de Factor VIII.

Ejemplo 1 - oximación de producto Intermedio 2 con 3-(mPEGyl)propanal para dar  $\text{N}^{\text{Gln}}$ -(3-(3-(mPEGyl)-propilideneaminoxi)propiloxi)FVIII

[0208] El mPEGyl es polidisperso y tiene un peso molecular de aproximadamente 20kDa. Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución de producto Intermedio 2: 1,74mg/ml en el tampón D;  
 - 3-(mPEGyl)propanal (20kDa)( $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$  ME-200AL de NOF): 12,9mg/ml en el tampón E; y  
 - 4-hidroxibenzaldehído (MW=122,13). Solución 13,8mg/ml en el tampón E.

[0209] A la solución del producto Intermedio 2 (77,6 $\mu\text{l}$ ; 135 $\mu\text{g}$ ) se le agregó un tampón E (2,4 $\mu\text{l}$ ) y la solución 3-(mPEGyl)propanal al tampón E (595 $\mu\text{l}$ , 7,7mg). La mezcla reactiva se incubó durante 3h a 25°C. Después se agregó la solución de 4-hidroxibenzaldehído (32,8 $\mu\text{l}$ ; 453 $\mu\text{g}$ ) (recubrimiento de fracciones de hidroxilamina no-reaccionada). La mezcla reactiva se incubó de nuevo durante 3h a 25°C.

[0210] El producto se purificó por intercambio iónico de la siguiente manera. La mezcla reactiva se diluyó ocho veces en el tampón C, y se aplicó en dos dispositivos de intercambio iónico Vivapure Q Mini M (número de producto de VivaScience VS-IX01QM24, VivaScience AG, Alemania) que previamente se había equilibrado con el tampón C. Después de dos fases de lavado con el mismo tampón, el producto de reacción se eluyó con el tampón de elución D.

[0211] La concentración de proteína se estimó midiendo la absorción a 280nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 14,6 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )(Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, EEUU) dando una recuperación de proteína estimada de 83%.

[0212] El producto se realizó en electroforesis en gel de poliacrilamida SDS usando NuPage 7% de gel de Tris- acetato (Invitrogen EA03555BOX) según las instrucciones del fabricante (70min a 150V). Los geles estaban teñidos con plata (Invitrogen LC6070). Las proteínas estándar eran de Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688).

[0213] El gel de SDS muestra que la cadena pesada es la más fuertemente modificada. Aparecieron varias bandas de MW más altos, como se esperaba. La banda de MW máximo aparece en aproximadamente 400kDa.

El producto se sometió a digestión de trombina:

5

[0214] La trombina (trombina humana, Roche diagnostica) se solubilizó en 20U/ml en H<sub>2</sub>O, y además se diluyó en 2U/ml en el tampón A. A una solución del producto del ejemplo 1 (2,9µl; 1,2µg) se agregó un tampón A (8,9µl) y la solución de trombina (0,24µl). La mezcla reactiva se incubó a 37°C durante 15min. Una digestión de trombina de FVIII se realizó en paralelo. Las mezclas de reacción se analizaron por HPLC en un Zorbax 300SB-C18, 0,21x15cm, 5µ. Los eluyentes fueron A: 0,1% de TFA en agua, y B: 0,07% de TFA en acetonitrilo. El flujo fue de 0,2ml/min, la temperatura de 40°C. El gradiente fue de la siguiente manera: de 0 a 15% más de 2min, de 15 a 80% más de 21 min, de 80 a 100%B más de 10min. La detección se hizo por UV (λ=280nm).

10

[0215] Los cromatogramas obtenidos mostraron que el valor máximo correspondiente al dominio A1 en el Factor VIII digerido por trombina (rastros azul) casi desapareció en la asimilación de trombina del FVIII pegilado de ejemplo 1 (rastros rojo). Así, el dominio A1 fue, de hecho, el más fuertemente modificado.

15

Ejemplo 2 - oximación del Intermedio 2 con el Intermedio 3 para dar NG<sup>Gln</sup>-(3-(4-(1-(3-((omega-(17-(carboxi)heptadecanoilamino)5 kDa PEGyl)carbamoil)bencilo)1,2,3-triazol-4-il)butilideneaminoxipropiloxi)FVIII

20

[0216] Se prepararon las siguientes soluciones:

- Intermedio 2: 2,36mg/ml en el tampón D;
- Intermedio 3 (MW: 5600): 1,79mM en el tampón E;
- Solución de 4-hidroxibenzaldehído: 17,3mg/ml en el tampón E; e
- Hidrocloruro de metoxilamina: 11mg/ml en el tampón E.

25

[0217] A la solución del Intermedio 3 (500µl; 848nmoles) en el tampón E se le agregó tampón E (644,3µl) y la solución del Intermedio 2 en el tampón E (105,9µl, 250µg). La mezcla reactiva se incubó durante 3h a 25°C. Solución de 4-hidroxibenzaldehído (50µl; 865µg) se agregó luego (recubriendo las fracciones de hidroxilamina no-reaccionada). La mezcla reactiva se incubó más durante 1 h a 25°C. El aldehído excedente se extinguió por adición de hidrocloruro de metoxilamina (62,5µl, 687µg). La mezcla reactiva se incubó de nuevo durante 30min a 25°C.

30

[0218] El producto se purificó por intercambio iónico de la siguiente manera. La concentración de sal se redujo a menos de 25mM de concentración de sal por dilución sucesiva (con tampón C) y fases de sobreconcentración en los dispositivos Amicon Ultra (corte 50kDa) (Millipore Corp., EEUU). La solución obtenida se aplicó en dos dispositivos de intercambio iónico Vivapure Q Mini M (número de producto de VivaScience VS-IX01QM24, VivaScience AG, Alemania) que previamente se había equilibrado con tampón C. Después de dos fases de lavado con el mismo tampón, el producto de reacción se eluyó con el tampón D de elución.

35

40

[0219] La concentración de proteína se estimó por medición de la absorción en 280nm ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 14,6 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Nanodrop ND-1 000, Nanodrop Technologies, Inc, EEUU) dando una recuperación de proteína estimada de 73%.

[0220] El producto se pasa por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS NuPage 7% de gel de Tris-acetato (Invitrogen EA03555BOX) según las instrucciones del fabricante (70min a 150V). Los geles eran teñidos con plata (Invitrogen LC6070). Las proteínas estándar eran de Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688).

45

[0221] El gel SDS mostró que la cadena pesada es de nuevo la más fuertemente modificada. Aparecieron varias bandas de MW más alto. La banda de MW máximo aparece en aproximadamente 120kDa.

50

[0222] El producto también se pasó por HPLC, en una columna C4, 0,21x5cm, 5µ (Vydac n°: 214TP5205).

[0223] Los eluyentes fueron A: 0,1 % de TFA en agua, y B: 0,07% de TFA en acetonitrilo. El flujo fue de 0,2ml/min, la temperatura 40°C. El gradiente fue de la siguiente manera: de 30 a 40% por encima de 3min, de 40 a 50% por encima de 60min, de 50 a 100%B por encima de 12,5min. La detección se realizó por UV (λ=280nm) y por fluorescencia λ Exc=280nm, Em=348nm).

55

[0224] Los cromatogramas obtenidos confirmaron que la cadena pesada fue, de hecho, la más fuertemente modificada.

60

Ejemplo 3 - oximación de Intermedio 2 con Intermedio 4

[0225] Se prepararon las siguientes soluciones:

- Intermedio 2: 2,36mg/ml en tampón D
- Intermedio 4 (MW= 122,1): 5,55mg/ml
- Hidrocloruro de metilhidroxilamina (MW=83,5): 10,2mg/ml en tampón E

65



columna, obtenida a partir de anticuerpos F25 (según se describe en, por ejemplo, la WO95/013301), que se había activado por CNBr. El material no unido se lavó. La columna se lavó con un tampón (5 ml) que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80 y 650 mM de NaCl, pH 7,35. Otra fracción se lavó con un tampón (5 ml) que consistía en 20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80 y 2,5 M de NaCl, 50 %v/v de etilenglicol, pH 7,35. El análisis SDS indicó que un conjugado de albúmina-FVIII pudo haberse lavado de la columna usando el último tampón (20 mM de imidazol, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de Tween 80 y 2,5 M de NaCl, 50 %v/v de etilenglicol, pH 7,35). El conjugado de albúmina-FVIII se identificó en el gel de SDS por bandas en aprox. 70 kDa y 90 kDa, correspondientes a los pesos moleculares de la cadena pesada y ligera al igual que a bandas en aproximadamente 140 kDa, y 160 kDa, correspondiente a la masa prevista de conjugados de albúmina de la cadena ligera y la cadena pesada respectivamente.

#### Ejemplo 6 - oximación de Intermedio 2 con Intermedio 6

para dar N<sup>Gln</sup>-(3-(4-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(Alexa 488-ilamino)etoxi)-etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi)-etilcarbamoil)benzilideneiminoxi)propiloxi)FVIII

Soluciones:

[0240]

- N<sup>Gln</sup>-3-aminoxi propiloxi)FVIII: 1,74 mg/ml en 20mM de tampón de imidazol conteniendo 0,02% de Tween 80,10% v/v de glicerol, 1M de NaCl, 10mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4  
 - Intermedio 6: 1,70mg/ml en el tampón G

Procedimiento:

[0241] A la solución de N-(3-(aminoxi)propiloxi)FVIII (115µl; 200µg) se añadió el tampón G (485µl), y la solución del Intermedio 6 (400µl, 678µg). La mezcla reactiva se incubó durante 3h30 a 25°C.

[0242] El aldehído excedente se extinguió por adición de hidrocloreuro de hidroxilamina metílica (25µl, 71µg). La mezcla reactiva se incubó de nuevo durante 45min a temperatura ambiente.

Purificación:

[0243] La purificación se hizo como en el ejemplo 4.

[0244] La concentración de proteína se estimó por medición de la absorción en 280nm

[0245] (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, EEUU) dando una recuperación de proteína estimada de 40%.

#### Ejemplo 7 - oximación de Intermedio 2 con Intermedio 8

Soluciones:

[0246]

- Intermedio 2: 2,74 mg/ml en 20mM de tampón de imidazol conteniendo 0,02% de Tween 80, 10% v/v de glicerol, 1 M de NaCl, 10mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4  
 - Hidrocloreuro de metilhidroxilamina en solución en 100mM de tampón de imidazol pH 6,5 conteniendo 0,02% de Tween 80, 10% v/v de glicerol, 10mM de CaCl<sub>2</sub>

Procedimiento:

[0247] A la solución del Intermedio 2 (91 µl, 250µg) se le añadió la solución del Intermedio 7 en el tampón G (175µl, 15,7mg). La mezcla reactiva se incubó durante 2h a 27°C.

[0248] El aldehído excedente se extinguió por adición de hidrocloreuro de metilhidroxilamina (12,5µl, 296µg). La mezcla reactiva se incubó de nuevo durante 30min a 27°C

Purificación:

[0249] La purificación se hizo como en el ejemplo 4. La concentración de proteína se estimó por medición de la absorción en 280nm (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc, EEUU) dando una recuperación de proteína estimada de 45%.

[0250] El producto se pasó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS NuPage 7% de gel de Tris-acetato (Invitrogen EA03555BOX) según las instrucciones del fabricante (70min a 150V). Los geles estaban teñidos con plata (Invitrogen LC6070). Las proteínas estándar eran de Invitrogen (HiMark HMW Standard LC5688).

5 [0251] Nuevamente, la cadena pesada de FVIII fue la más fuertemente modificada, el conjugado colomínico de ácido-FVIII se identificó en el gel SDS por una amplia y difusa banda presente entre 93 y aproximadamente 140kD.

Ejemplo 8: oximación de Intermedio 2 con Intermedio 9

10 [0252] Al Intermedio 2 (210µg; 1,42nmol) en solución en el tampón E (44µl) se le agregó una solución de C<sup>34</sup>-(1-(5-(2-(ω-(3-(4-(formil)benzoilamino)propilcarbamoilmetil)3 kDa PEGyl)-etilcarbamoil)pentil)2,5-dioxopirrolidin-3-il)albúmina (100µg, 1,41nmol) en solución en el tampón E (10µl). Una solución de anilina de 0,3M en el tampón E fue añadida (2µl). La reacción se incubó durante toda la noche a 30°C.

15 [0253] El exceso de Intermedio 2 se extinguió por adición de 4-hidroxibenzaldehído (1,46µg) en agua (2µl). La mezcla se dejó durante 1 h a 30°C.

20 [0254] La mezcla se diluyó 1:11 (v/v) con tampón C antes de purificación por intercambio de anión en el Vivapure Q mini M (VivaScience): tras la carga, el material se lavó con tampón C y se eluyó con tampón D. El eluato se sometió luego a cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). El flujo fue 0,5ml/min, y el eluyente fue un tampón que consistía en sacarosa (3g/l), histidina (1,5g/l), cloruro sódico (18g/l), Tween 80 (0,1g/l), cloruro de calcio (0,25g/l), pH7,3.

25 [0255] Un análisis SDS PAGE mostró la presencia de bandas en aproximadamente 166kD, 228kD y 332kD, que se asignaron a modo de tentativa para acoplamiento de una, dos o tres fracciones de C<sup>34</sup>-(1-(5-(2-(ω-(3-(4-(formil)benzoilamino)propilcarbamoilmetil)3 kDa PEGyl)etilcarbamoil)-pentil)2,5-dioxopirrolidin-3-il)albúmina respectivamente en la cadena pesada de FVIII.

Análisis de actividad cromogénica de FVIII - prueba de COA

30 [0256] La actividad de un FVIII conteniendo una muestra se puede determinar con una prueba de COA disponible comercialmente (COATEST® SP FVIII, Chromogenix Art. No.: 82 4086 63).

Determinación de parámetros farmacocinéticos

35 [0257] Se usaron 15 ratones KO FVIII criados en Taconic M&B con un peso aproximado de 21,8 g para el estudio. A los ratones se les dosificaron los compuestos en una única inyección en la vena de la cola y fueron anestesiados con Isofluran/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O para muestra de sangre. Se tomaron muestras de sangre de dos o tres ratones en puntos temporales a 0,08, 0,33, 1, 3, 7, 16, 24, 48, 64 h post administración del plexo orbital. Se tomaron muestras de 4 gotitas de sangre del ojo usando un tubo de vidrio capilar de 10 µl. Después de la tercera muestra de sangre, los ratones fueron matados por dislocación cervical. 45 µl de sangre se transfirió a tubos de Eppendorf conteniendo 5 µl de citrato de sodio (0,13 M). 200 µl de tampón Coatest SP FVIII se agregó y la sangre diluida se centrifugó en 4000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se analizó mediante análisis de antígeno en ELISA y actividad cromogénica.

45 Tabla 1 compuestos y dosis

Descripción del compuesto	Example nº	Dosis IU/kg	Volumen dosis (ml/kg)	Conc.* (IU/ml)
Producto de reacción de Intermedio 2 e Intermedio 3	2	280	5	56
Producto de reacción de Intermedio 2 e Intermedio 4	3	280	5	56
Producto de reacción de Intermedio 2 con 3-(mPEGyl)propanal	1	280	4,30	65,1

50 Tabla 2 parámetros PK obtenidos según NCA

Ensayo	Ejemplo	Cmax (IU/l)	AUC (h*IU/l)	AUC extrap (%)	T½ (h)	Cl (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)	MRT (h)
COA de FVIII	1	2945	36751	1	11	7,6	116	15
COA de FVIII	2	2504	37258	5	13	6,9	137	20
COA de FVIII	3	4534	46025	2	9,3	10	121	12

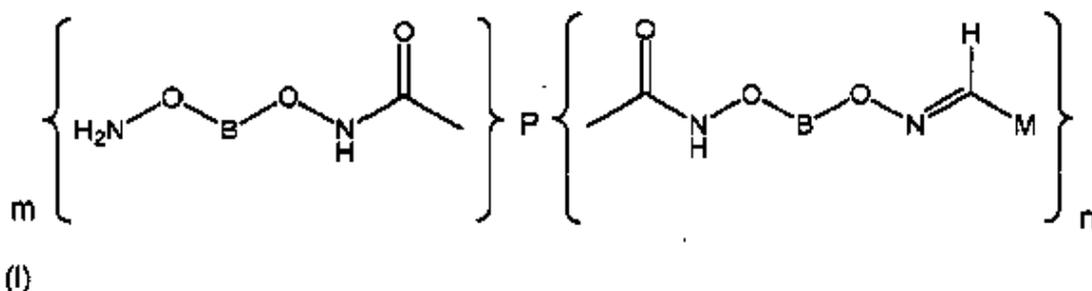
ES 2 401 965 T3

COA de FVIII	BDD-FVIII	2740	26000	3	7,8	11	117	11
ELISA de FVIII	1	2557	30635	8	13	9,1	160	17
ELISA de FVIII	2	2750	39054	4	13	7,2	128	18
ELISA de FVIII	3	3020	27927	3	9,6	10	126	13
ELISA de FVIII	BDD-FVIII	1990	20000	10	8,2	14	159	12

5 [0258] Una prolongación o ligera prolongación de la vida media terminal (9,3-13 h) se observa después de administración i.v. de los tres compuestos en comparación con el FVIII con el dominio B eliminado (BDD-FVIII) (7,8-8,2 h) cuando se mide por actividad cromogénica de FVIII y ELISA de FVIII. El periodo de permanencia medio (MRT) aumentó de forma similar en los tres compuestos (12-20 h) en comparación con BDD-FVIII (11-12 h). Además, el aclaramiento de los compuestos se redujo (6,9-10 ml/h/kg) en comparación con BDD-FVIII (11-14 ml/h/kg).

REIVINDICACIONES

5 1. Derivado de Factor VIII de la fórmula (I):



donde:

10

B representa un alquileo  $C_2$  a  $C_{10}$ ;

m representa 0 o un número entero de 1 a 19, n representa un número entero de 1 a 20 y la suma de m y n es de 1 a 20;

15

P representa un mono o polirradical de Factor VIII obtenido por eliminación de los grupos de carbamoil  $m + n$  a partir de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII; y

M representa una fracción ( $M^1$ ) que aumenta la vida media en plasma del derivado de Factor VIII o una fracción indicadora ( $M^2$ );

o una sal derivada farmacéuticamente aceptable.

20

2. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 1, donde dicha fracción  $M^1$  comprende una o más fracciones de polietilenglicol (PEG), polipéptidos o ligantes de proteína plasmática.

3. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 2, donde dicho péptido es albúmina o un anticuerpo o fragmento de la misma.

25

4. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 2, donde dicho ligante de proteína plasmática es un ligante de albúmina.

30

5. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 2, donde dicha fracción  $M^1$  comprende una fracción de polietilenglicol (PEG).

6. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 1, donde:

35

B representa un alquileo  $C_2$  a  $C_4$ ;

m representa 0 o un número entero de 1 a 5, n representa un número entero de 1 a 6 y la suma de m y n es de 1 a 6; y

M representa una fracción ( $M^1$ ) que comprende una fracción de polietilenglicol (PEG) y/o un ligante de albúmina.

40

7. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 1, donde:

B representa un alquileo  $C_2$  a  $C_4$ ;

m representa 0 o un número entero de 1 a 5, n representa un número entero de 1 a 6 y la suma de m y n es de 1 a 6 y

45

M representa una fracción ( $M^2$ ) que comprende biotina o un marcador fluorescente.

8. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 6 o 7 donde B representa un alquileo  $C_3$ .

50

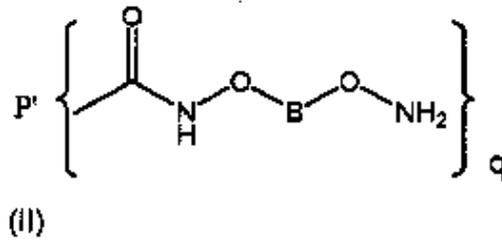
9. Composición farmacéutica que comprende un derivado de Factor VIII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10. Derivado de Factor VIII tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

55

11. Derivado de Factor VIII según la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de la hemofilia A.

12. Derivado de Factor VIII de la fórmula (II):



5

donde:

B representa un alquileo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>;

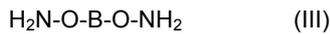
q representa un número entero de 1 a 20 y

10

P' representa un mono o polirradical de Factor VIII obtenido por eliminación de los grupos de carbamoil q a partir de las cadenas laterales de los residuos de glutamina presentes en el Factor VIII; o una sal derivada farmacéuticamente aceptable.

15

13. Método para preparar un derivado de Factor VIII de la fórmula (II) tal y como se define en la reivindicación 12, este método comprende la reacción de Factor VIII con un compuesto de la fórmula (III):



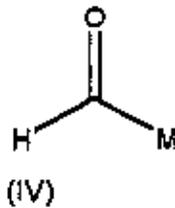
20

en presencia de una transglutaminasa, donde B es tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

14. Método según la reivindicación 13, donde la transglutaminasa es transglutaminasa de *Streptomyces mobaraense*.

25

15. Método para preparar un derivado de Factor VIII de la fórmula (I), tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la reacción de un derivado de Factor VIII de la fórmula (II), tal y como se define en la reivindicación 12, con un aldehído de la fórmula (IV):



30

donde M es tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 7.